

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Análise da resposta imunitária celular  
à *Leishmania* sp. em murganhos  
tratados e vacinados

**Maria Inês Correia Vale de Gato**

Mestrado Microbiologia Aplicada

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



# Análise da resposta imunitária celular à *Leishmania sp.* em murganhos tratados e vacinados

**Maria Inês Correia Vale de Gato**

Mestrado Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada pela Prof. Doutora Gabriela Santos-Gomes (Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) CMDT-LA, UEI de Leishmaniose, Rua da Junqueira, Nº 96, Portugal projecto) e pela Prof. Doutora Rita Zilhão (Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal, Campus da FCUL, 1749-016 Lisboa, Portugal).

2009

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>1</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>2</b>
<b>RESUMO</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>I. INTRODUÇÃO GERAL</b>	
<b>1. Leishmaniose – A doença</b>	
1.1 Epidemiologia	5
1.2 Distribuição geográfica	7
1.3 Ciclo de vida do parasita	7
<b>2. Diagnóstico da Leishmaniose</b>	<b>8</b>
<b>3. Controlo</b>	
3.1 Terapêutica	9
3.2 Prevenção e profilaxia	10
<b>4. Relação parasita/hospedeiro</b>	
4.1 Sistema imunitário	12
4.2 Imunidade na Leishmaniose	14
<b>II. OBJECTIVOS GERAIS – ESTUDOS DA RESPOSTA IMUNITÁRIA</b>	<b>17</b>
<b>III. ANÁLISE DA ACTIVIDADE TERAPÊUTICA DE NOVOS COMPOSTOS SINTÉTICOS DURANTE A INFECÇÃO POR <i>L. infantum</i></b>	
<b>1. Introdução e objectivos</b>	<b>18</b>
<b>2. Material e métodos</b>	
2.1 Animais e parasitas	18
2.2 Infecção	19
2.3 Tratamento	19
2.4 Determinação da carga parasitária	20
2.5 Avaliação do padrão expresso de citocinas por PCR em tempo real	20
2.6 Análise estatística	22
<b>3. Resultados e discussão</b>	
3.1 Carga parasitária após o tratamento	22
3.2 Citocinas expressas no murganho após tratamento	24

#### **IV. AVALIAÇÃO IMUNOPROTECTORA DE TRÊS FRACÇÕES PROTEICAS ANTIGÉNICAS LIBERTADAS POR PROMASTIGOTAS DE *L. shawi***

<b>1. Introdução e objectivos</b>	<b>27</b>
<b>2. Material e métodos</b>	
2.1 Animais e parasitas	28
2.2 Imunização e infecção	29
2.3 Determinação da carga parasitária	29
2.4 Isolamento das células TCD4+ e CD8+ e dnCD4/CD8	30
2.5 Análise estatística	31
<b>3. Resultados e discussão</b>	
3.1 Carga parasitária	31
3.2 Citocinas expressas nos murganhos após vacinação com cada fracção proteica	32

#### **V. ESTUDO DA CAPACIDADE IMUNOPROTECTORA DE DUAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *L. infantum***

<b>1. Introdução e objectivos</b>	<b>37</b>
<b>2. Material e métodos</b>	
2.1 Animais e parasitas	38
2.2 Proteínas recombinantes e obtenção de antígeno total de <i>L. infantum</i>	39
2.3 Vacinação/imunização e infecção	39
2.4 Avaliação da capacidade imunoprotectora das proteínas recombinantes	40
2.5 Análise estatística	40
<b>3. Resultados e discussão</b>	
3.1 Determinação da carga parasitária	41
3.2 Citocinas expressas nos murganhos após vacinação com cada proteína recombinante	41

#### **VI. CONCLUSÃO GERAL**

**47**

#### **VII. BIBLIOGRAFIA**

**48**



## AGRADECIMENTOS

Em especial agradeço à minha orientadora Prof. Dra. Gabriela Santos-Gomes, por me ter acolhido no seu grupo de investigação, pela orientação prática e teórica, pela transmissão de conhecimentos, pela preocupação e pelo apoio nos piores momentos, pelos conselhos ao longo deste ano que me fizeram crescer como cientista e principalmente pela amizade e carinho demonstrados. Agradeço ainda à Prof. Dra. Rita Zilhão por ter aceitado com muito trabalho entre mãos ser a minha co-orientadora e pela disponibilidade que sempre demonstrou para me ajudar. Gostaria de agradecer em especial à Dra. Cláudia Marques, sem ela nada disto seria possível, obrigada por toda a orientação prática, disponibilidade e paciência demonstrada, força nisso. A todos os meus colegas da unidade de Leishmanioses, pelo apoio, boa disposição e amizade: Dras. Sofia Cortes e Carla Maia, Mestre Marta Marcos, Mónica Marques e Armanda Rodrigues. Aos técnicos da unidade, Sr. Manuel Cristóvão pela disponibilidade e simpatia demonstrada e ao Sr. João Ramada pela boa disposição e falta de juízo que me fazia rir em dias mais difíceis. À minha família pela paciência durante as minhas ausências nos encontros de família e por me apoiarem nas minhas decisões. A todos os meus amigos que contribuíram para este trabalho, que me aturaram, divertiram, mantiveram bem disposta e apoiaram em todas as minhas decisões. Em especial ao meu grupo de amigos de curso de Microbiologia, às “Imagens” e à dança que sem elas o meu estado de espírito seria outro, e aos meus amigos de muitos anos da praceta. Em especial ao Bernardo Moreira que esteve sempre a meu lado.<sup>1</sup>

### **No presente trabalho estão incluídos os resultados dos artigos que se encontram submetidos para publicação ou em fase final de redacção:**

Passero LFD., Marques C., Vale-Gato I., Corbett CEP., Laurenti MD., Santos-Gomes G. Histopathology, humoral and cellular immune response in the murine model of *Leishmania (Viannia) shawi*. (artigo submetido à Parasitology International).

Passero LFD., Marques C., Vale-Gato I., Corbett CEP., Laurenti MD., Santos-Gomes G. Predominant Th1 immune response associated to protective effects induced by low proteic fraction isolated from supernatant of *Leishmania (viannia) shawi*” (artigo em preparação).

### **No presente trabalho estão incluídos os resultados das seguintes comunicações**

Passero LFD., Marques C., Vale-Gato I., Corbett CEP., Laurenti MD., Santos-Gomes G. (2009) Released proteins from *Leishmania (viannia) shawi* induce protection in experimental leishmaniasis. XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Março de 2009, Recife, Brasil.

Passero LFD., Marques C., Vale-Gato I., Laurenti MD., Corbett CEP., Santos-Gomes G. (2009) Cellular and humoral immune response in BALB/c mice infected with *Leishmania (viannia) shawi*. XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia e X Simpósio Internacional de Alergia e Imunologia Clínica. Setembro de 2009, Salvador, Brasil.

---

<sup>1</sup> Este trabalho foi financiado pelos projectos POCI/CVT/56995/2004 e PTDC/CVT/70275/2006 pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (Portugal) e pelo POCI 2010 com a participação do Fundo europeu FEDER

## LISTA DE ABREVIATURAS

- **A** – absorvância
- **AgT** – antígeno solúvel total
- **BSA** – “bovine serum albumine”
- **cDNA** – ácido desoxiribonucleico complementar
- **CifA** – ciclofilina A
- **Ct** – “cycle threshold”
- **DEPC** – dietilpirocarbonato
- **DNA** – ácido desoxiribonucleico
- **DNase** – desoxiribonuclease
- **dNTPs** – 3’ – desoxinucleotídeo trifosfatos
- **EDTA** – ácido acético treta-etilenodiamino
- **g** – grama
- **HPRT** – “hypoxanthine-guanine phosphoribozyl transferase”
- **IFN  $\gamma$**  - interferon gama
- **Ig** - imunoglobulina
- **IL** – interleucina
- **LC** – leishmaniose cutânea
- **LMC** – leishmaniose mucocutânea
- **LVZ** – leishmaniose visceral zoonótica
- **MHC** – complexo maior (ou major) de histocompatibilidade
- **mRNA** – ácido ribonucleico mensageiro
- **NK** – “natural killer”
- **NO** – óxido nítrico
- **PBS** – tampão fosfato salino
- **RNA** – ácido ribonucleico
- **RPMI** – “Roswell Park Memorial Institut”
- **RT** – transcrição reversa
- **SCH** – Meio rico de crescimento Schneider
- **SOD** – superóxido dismutase
- **TFL6** – 4-(2,6-Dinitro-4-trifluorometil-fenilamina)-fenol
- **TFL7** - 2-(2,6-Dinitro-4-trifluorometil-fenil-butilamina)-etanol)
- **TFL6LIP** - 4-(2,6-Dinitro-4-trifluorometil-fenilamina)-fenol incluído em lipossoma
- **TFL7LIP** - 2-(2,6-Dinitro-4-trifluorometil-fenil-butilamina)-etanol) incluído em lipossoma
- **TGF -  $\beta$**  – factor transformador de crescimento beta
- **Th** – células “helper”
- **TNF -  $\alpha$**  - factor de necrose tumoral alfa
- **T<sub>reg</sub>** – Células T reguladoras
- **U** - unidades

## RESUMO

A compreensão das respostas imunológicas associadas à susceptibilidade ou à resistência do hospedeiro à infecção por *Leishmania* é fundamental para o desenvolvimento de ferramentas imunoproláticas (vacinas), e para a implementação de novos compostos terapêuticos, mais eficazes e menos tóxicos, tornando o controlo da leishmaniose mais eficiente.

A compreensão da resposta imunitária celular desenvolvida no modelo animal roedor (*Mus musculus*) através da determinação do padrão de expressão de citocinas pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, permitiu-nos analisar o tipo de resposta imunitária (Th1, Th2, Th3 ou Th17; Tc1 ou Tc2) que poderá ser desenvolvida, e relacioná-la com a carga parasitária presente nos órgãos onde leishmania se multiplica (consoante a espécie).

Neste trabalho, avaliou-se a actividade terapêutica de dois novos compostos sintéticos (TFL 6 e TFL7) no tratamento da infecção por *L. infantum*, e o efeito imunoprotector (vacinação) de três fracções proteicas (High, Inter e Low) e de duas proteínas recombinantes, ciclofilina A e Superóxido dismutase (CifA e SOD) na leishmaniose cutânea do novo mundo e na leishmaniose visceral zoonótica, respectivamente

Ambos os compostos induziram redução da carga parasitária, no entanto os animais tratados com o TFL6 não sofreram alterações na resposta imunitária celular em relação ao grupo controlo, enquanto que o TFL7 induziu o desenvolvimento de uma resposta regulatória com níveis elevados de IL-10.

As fracções Inter e Low induziram uma acentuada redução da multiplicação de *L. shawi* na derme, acompanhada por uma resposta imunitária do tipo Th1 associada à resistência à infecção.

A proteína recombinante CifA impediu o estabelecimento da infecção por *L. infantum* e induziu o desenvolvimento de uma resposta citotóxica.

Este trabalho incentiva a continuação de estudos no desenvolvimento de potenciais vacinas e novos fármacos para o controlo das várias formas clínicas de leishmaniose.

**Palavras chave:** Resposta imunitária, *L. infantum*, *L. shawi*, Imunização, Células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>

## ABSTRACT

The understanding of the immune responses associated to susceptibility or resistance of the host infected by *Leishmania* is important for the development of immunoprophylactic tools (vaccines) and for the implementation of more effective and less toxic new therapeutic compounds improving the control of leishmaniasis.

The analysis of the cellular immune response developed in a rodent model (*Mus musculus*) by evaluation of the cytokines expressed by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, allowed us to know what kind of response (Th1, Th2, Th3 and Th17; Tc1 or Tc2) predominates in association with the parasite load present in the organs where *Leishmania* replicates.

In this study, the therapeutic activity of two new synthetic compounds (TFL6 and TFL7) against *L. infantum* and the immunoprotective effect (vaccination) of three proteic fractions (High, Inter and Low) and two recombinant proteins, cyclophilin A and superoxide dismutase (CifA and SOD) were evaluated for new world cutaneous leishmaniasis and zoonotic visceral leishmaniasis, respectively.

Both compounds induced a high reduction of parasite load, but the animals treated with TFL6 had cellular immune response identical to the control group, while the expression of cytokines in animals treated with TFL7 suggest the development of a regulatory immune responses.

Inter and Low fractions evidenced an accentuated reduction of *L. shawi* replication in the dermis associated to a prevalent Th1 immune response which is associated to resistance to infection.

The immunization of mice with recombinant protein cyclophilin A protein caused the apparent elimination of the parasite associate to a cytotoxic immune response

This work encourages further studies on the development of potential vaccines and new drugs for the control of different clinical forms of leishmaniasis.

**Keywords:** Immune response, *L. infantum*, *L. shawi*, Immunization, T CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells

## I. INTRODUÇÃO GERAL

### 1. LEISHMANIOSE – A DOENÇA

#### 1.1 Epidemiologia

A Leishmaniose é uma doença infecciosa e uma zoonose<sup>2</sup>, causada por um conjunto de espécies de parasitas protozoários intracelulares da família *Trypanosomatidae* Doflin, 1901 do género *Leishmania* Ross, 1903 (Croft *et al.*, 2006; João *et al.*, 2006).

O parasita é transmitido através da picada de insectos flebótomos dos géneros *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1843 e *Lutzomyia* França, 1924 dependendo da região geográfica. No Velho Mundo<sup>3</sup> *Leishmania* é transmitida por fêmeas hematófagas de *Phlebotomus* e no Novo Mundo<sup>4</sup> por *Lutzomyia* (João *et al.*, 2006, Neuber, 2008).

Das 30 espécies de *Leishmania* identificadas, 21 infectam o Homem (Shaw, 1994), e das 500 espécies de flebótomos conhecidas, 30 são vectores desta parasitose (WHO, 2007). A maioria das infecções ocorre como zoonoses de animais selvagens ou domésticos sendo o homem infectado acidentalmente quando exposto ao ciclo natural de transmissão (Moreno & Alvar, 2002).

Os reservatórios<sup>5</sup> podem ser hospedeiros<sup>6</sup> invertebrados ou vertebrados como é o caso dos animais selvagens (roedores, raposas e lobos) e do cão doméstico (Neuber, 2008), desde que constituam uma fonte de infecção para o Homem e permitam a multiplicação do parasita. Podem classificar-se em reservatórios primários ou secundários, estando os primários associados aos animais selvagens e os secundários aos reservatórios domésticos como o cão, que podem chegar a desenvolver a doença.

A leishmaniose apresenta várias manifestações clínicas bem como diferentes evoluções da infecção dependendo da espécie infectante, do grau de virulência do parasita e da imunidade do hospedeiro (Murray *et al.*, 2005). Com base nas diferentes manifestações clínicas, a leishmaniose pode ser classificada em três tipos: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV) ou Kala-azar (João *et al.*, 2006).

A leishmaniose cutânea (LC) caracteriza-se por lesões na pele simples ou múltiplas, localizadas ou difusas, podendo dar origem a cicatrizes. Tem como reservatórios principais, roedores, marsupiais e desdentados. A sua distribuição abrange o Velho e

---

<sup>2</sup> **Zoonose** - São doenças de animais transmissíveis ao homem, bem como aquelas transmitidas do homem para os animais. Os agentes que desencadeiam essas infecções podem ser microrganismos diversos, como bactérias, fungos, vírus, parasitas e rickettsias.

<sup>3</sup> **Velho Mundo** - Europa, Ásia e África

<sup>4</sup> **Novo Mundo** - América

<sup>5</sup> **Reservatório** - É um animal que alberga o agente etiológico de determinada doença e o elimina para o meio exterior com capacidade infectante.

<sup>6</sup> **Hospedeiros** - É um organismo que abriga outro no seu interior, seja este um parasita, um comensal ou um mutualista.



o Novo Mundo, diferenciando-se nas espécies infectantes, reservatórios e características clínicas. Pode ser causada por inúmeras espécies tais como: *Leishmania major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. infantum*, *L. shawi*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni* e *L. naiffi*. As duas últimas espécies só recentemente foram descritas em casos humanos (Murray *et al.*, 2005; Neuber, 2008).

A leishmaniose mucocutânea (LMC) inicia-se sob a forma de lesão na pele, semelhantes às da leishmaniose cutânea, mas a infecção pode progredir atingindo as mucosas como o nariz, boca, garganta e tecidos circundantes (Neuber, 2008), dando origem a mutilações faciais. É causada essencialmente pelas espécies *L. braziliensis* e *L. peruviana*, apesar de quase todas as espécies do Novo Mundo causadoras de leishmaniose cutânea, após causarem lesão na pele, poderem evoluir para leishmaniose mucocutânea. A maioria dos hospedeiros são roedores e os cães foram mais recentemente identificados como hospedeiros secundários (Pereira, 2003).

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença sistémica, a forma mais grave e complicada de todas as leishmanioses. O parasita invade particularmente órgãos e tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocítico, como o baço, o fígado, a medula óssea e os gânglios linfáticos. A doença caracteriza-se por febre, hepatoesplenomegalia<sup>7</sup> e hiperproteinemia<sup>8</sup>. A anemia e a leucopenia constituem outros parâmetros frequentes. A evolução da doença é progressiva, podendo ser fatal se não tratada (João *et al.*, 2006; Neuber, 2008).

Existem dois tipos de leishmaniose visceral que diferem nos seus aspectos epidemiológicos, a leishmaniose visceral zoonótica (LVZ) que é transmitida do animal para o vector e deste para o Homem e a leishmaniose visceral antroponótica (LVA) que é transmitida do Homem para o vector e deste novamente para o Homem. A LVZ envolve a transmissão de *L. infantum*, e a LVA a transmissão de *L. donovani* (Chappuis *et al.*, 2007).

A LVZ afecta principalmente cães e humanos, sendo o cão o reservatório e hospedeiro principal, apesar dos lobos, raposas e chacais poderem ser responsáveis também por ciclos selvagens (Abranches *et al.*, 1983, 1984; Nieto *et al.*, 1999; Gradoni *et al.*, 2005). O cão pode sofrer uma doença severa caracterizada por evolução crónica com sinais viscerocutâneos (Gradoni *et al.*, 2005), apresentando lesões na pele, perda de peso, linfadenopatia, lesões oculares e falha renal (Chamizo *et al.*, 2005), enquanto que os humanos apresentam essencialmente manifestações viscerais (Rosa, 2005).

---

<sup>7</sup> **Hepatoesplenomegalia** - É o aumento do tamanho do fígado e do baço, provocado pela presença do parasita e pela actividade de defesa do sistema imunológico do hospedeiro.

<sup>8</sup> **Hiperproteinemia** - É a elevação da concentração de proteínas no soro sanguíneo, frequentemente devido a excesso de globulinas.

### 1.2 Distribuição geográfica

A leishmaniose ocorre essencialmente nas regiões tropicais e subtropicais. Está presente em todos os continentes com excepção da Austrália e Antártida. A América do Sul e Central, o Sul da Europa, o Norte e Leste de África, Médio Oriente e Subcontinente Indiano contêm zonas endémicas de leishmanioses (Croft *et al.*, 2006).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2007) a leishmaniose é endémica em 88 países (66 no Velho Mundo e 22 no Novo Mundo), 72 dos quais são países em desenvolvimento. Estima-se a ocorrência de 2 milhões de novos casos por ano, 350 milhões de pessoas estão em risco de ficarem infectadas e encontram-se infectadas cerca de 12 milhões de pessoas, morrendo 60 000 pessoas por ano (Zambrano-Villa *et al.*, 2002; Desjeux, 2004, Croft *et al.*, 2006; WHO, 2007; Neuber, 2008).

A maioria (90%) dos casos de LV ocorre no Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão.

A LMC está distribuída por países como a Bolívia, Brasil e Perú e, 90% dos casos de LC encontram-se no Afeganistão, Brasil, Irão, Perú, Arábia Saudita e Síria (WHO, 2007).

Nos países do mediterrâneo e em Portugal, a espécie *L. infantum* é responsável pela maioria dos casos de leishmaniose visceral humana e canina (LCan), sendo o cão o reservatório principal do parasita, uma vez que coabita com o Homem e tem um contacto frequente com os insectos vectores.

Em Portugal existem três focos principais de LV, a região do Alto-Douro, a região metropolitana de Lisboa e o Algarve, sendo a incidência mais elevada na região do Alto Douro (João *et al.*, 2006). Na região metropolitana de Lisboa, verificam-se mais casos humanos nas zonas urbanas do que nas rurais.

Durante as décadas de oitenta e noventa verificou-se um aumento da incidência desta parasitose, principalmente da forma visceral, causada pelo aumento de indivíduos imunodeprimidos devido à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV).

### 1.3 Ciclo de vida do parasita

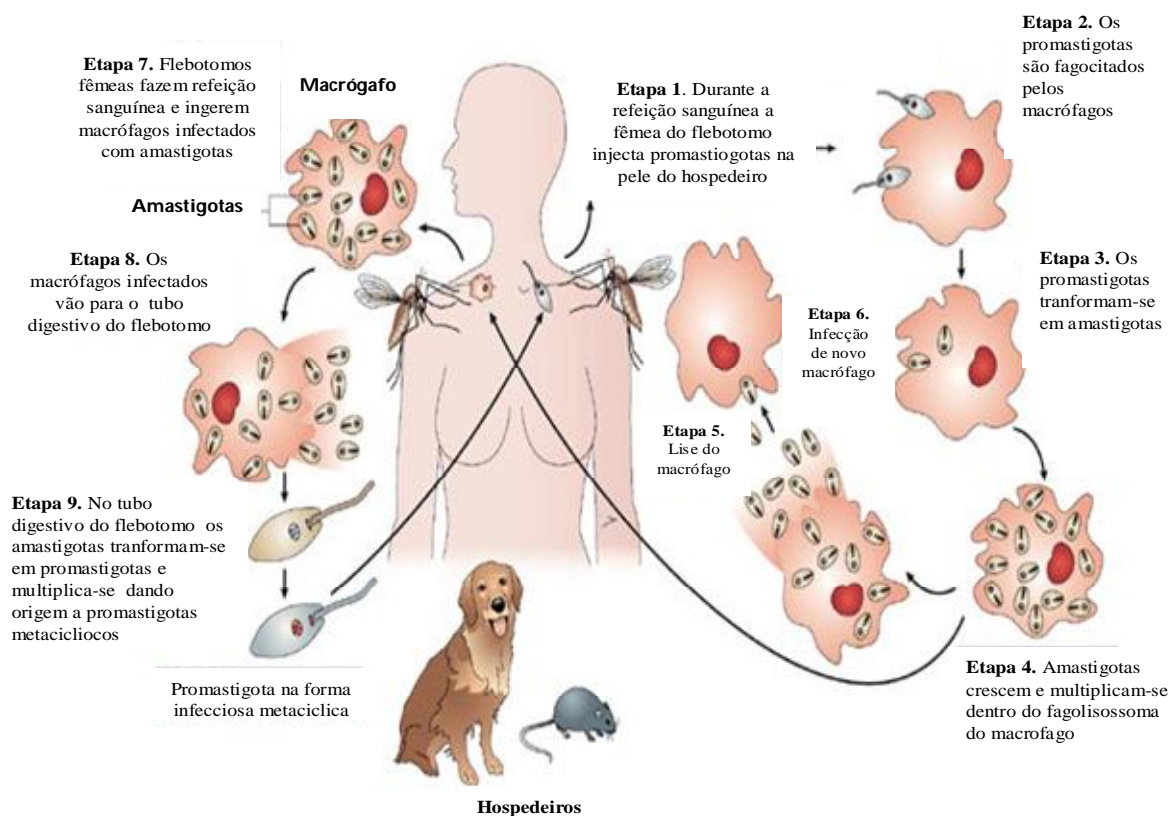
Protozoários do género *Leishmania* são seres unicelulares eucariotas heterotróficos com reprodução assexuada por fissão binária. São considerados parasitas, logo dependem de outros seres vivos para sobreviverem e se reproduzirem.

O parasita apresenta duas formas no seu ciclo de vida (dimórfico): uma forma promastigota, no insecto vector (flebotomo), e uma forma amastigota intracelular obrigatória no hospedeiro vertebrado. Ambas as formas têm um núcleo, uma única mitocôndria e um cinetoplasto que corresponde ao DNA mitocondrial condensado na região perto do corpo basal.

As formas promastigotas são alongadas, móveis e flageladas, e encontram-se no aparelho digestivo do vector, onde os promastigotas se podem diferenciar em duas formas principais:

os promastigotas procíclicos e os promastigotas metacíclicos que representam a forma infecciosa. As formas amastigotas são arredondadas e sem flagelo, multiplicando-se nos fagolisossomas dos macrófagos do hospedeiro vertebrado (Cohen-Freue *et al.*, 2007).

O ciclo de vida do parasita está representado esquematicamente por etapas da 1 à 7 na figura 1 abaixo apresentada.



**Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida do parasita *Leishmania*** (Adaptado de Lipdová & Dermant, 2006).

## 2. DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE

Existem dois conjuntos de métodos de diagnóstico da leishmaniose: o diagnóstico parasitológico por detecção do DNA do parasita ou do próprio parasita nas lesões ou tecidos infectados, e o diagnóstico seroimunológico com detecção de anticorpos anti-leishmania.

**DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO:** É o mais simples e mais utilizado, baseia-se em três metodologias (Fonseca & Brito, 2008): i. **Detecção microscópica (exame directo)** das formas amastigotas dentro dos macrófagos após coloração com Giemsa a partir de biópsias das lesões cutâneas, da medula óssea, hepáticas e esplénicas; ii. **Exame cultural** do parasita permite o isolamento de promastigotas a partir de material biológico recolhido (aspirados dos gânglios ou medula óssea). É feito pela inoculação do material biológico em meio específico ou meios líquidos comercializados com soro fetal de bovino (FBS); iii. **Diagnóstico molecular** que envolve a detecção do DNA do parasita pela técnica de



“Polymerase chain reaction” (PCR), a partir de uma amostra biológica. Já a PCR em tempo real é uma técnica muito útil para a quantificação do parasita, permitindo avaliar a carga parasitária e a resposta à terapêutica (Maia *et al.*, 2009).

**DIAGNÓSTICO SEROIMUNOLÓGICO:** Este diagnóstico envolve métodos que se baseiam todos na detecção de anticorpos circulantes (IgG) anti-leishmania com utilização de antígenos: i. **A imunofluorescência indirecta (IFI)**, que é um dos testes mais utilizados e de maior sensibilidade. Permite a detecção de anticorpos totais/circulantes e distingue a fase aguda de infecção da fase de remissão após tratamento; ii. **“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA)** é uma técnica útil nos rastreios para estudos epidemiológicos, pois permite a análise simultânea de um grande número de amostras. Mas não é eficaz no seguimento da infecção (fase aguda, fase de remissão) (Singh, 2006); iii. **O teste de aglutinação directa (DAT)** permite obter resultados de fácil leitura e interpretação rápida e pode ser utilizada em grande escala, no entanto não distingue indivíduos saudáveis de indivíduos em fase de remissão (Singh, 2006); iv. **A Contraimuno-electroforese (CIE)** é uma técnica simples e rápida que utiliza quantidades reduzidas de antígeno (Barbosa *et al.*, 1973); v. **Western-Blot (WB)** é aplicado no diagnóstico de LV, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, e apresenta elevada sensibilidade.

### 3. CONTROLO

#### 3.1 Terapêutica

O sucesso para o tratamento das leishmanioses depende do nível de desenvolvimento da infecção, da susceptibilidade do hospedeiro, da virulência da espécie infectante e da precocidade do diagnóstico. Existem cerca de 25 compostos com efeito anti-leishmania, mas apenas alguns são classificados como drogas anti-leishmania e utilizados para os seres humanos. Actualmente os antimoniais pentavalentes são os fármacos de primeira linha contra todas as formas de leishmaniose, como o antimoniato de glucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®). No entanto, estes compostos são limitados na eficácia e apresentam elevada toxicidade, assim como promovem a resistência medicamentosa (Sundar, 2001).

A tabela 1 sumariza os fármacos mais comumente utilizados no tratamento das leishmanioses, bem como os seus mecanismos de acção e características.

Uma série de outros fármacos têm sido utilizados como segunda linha de tratamento das leishmanioses (Farraia & Meireles, 2008), como por exemplo as Diamidinas, Anfotericina B, Aminosidina, derivados do Imidazol (antifúngico), Alopurinol (análogo das purinas), as Dinitroanilinas (Trifluralina e Orizalina), Miltefosina (fosfolípido), Imunomoduladores, Levamizol, citocinas e vectores de medicamentos, mas nenhum com elevada eficácia,

toxicidade aceitável e de baixo custo, (Farraia & Meireles, 2008). Torna-se, por esta razão, cada vez mais premente o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos alternativos ao tratamento da leishmaniose, que apresentem menor toxicidade, maior eficácia e custo aceitável.

**Tabela 1. Sumário de alguns fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose** (Murray *et al.*, 2004; Croft *et al.*, 2006; Farraia & Meireles, 2008; Carvalheiro *et al.*, 2009).

Nome	Mecanismo de acção	Eficácia e toxicidade
Antimoniais pentavalentes – Glucantime® e Pentostan®	Destruição das leishmanias por inibição da síntese de ATP e GTP.	Recidivas devido à resistência Reduzida eficácia em alguns casos.
Diamidinas - Pentamidina	Desorganização do metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos, alterações nas mitocôndrias, ribossoma e cinetoplasto.	Toxicidade superior e eficácia inferior em relação aos antimonias.
Anfotericina B - Fungizone® e/ou Anfotericina com lipossomas (vectores de medicamentos)	Antifúngico. Ligação aos esteróis da membrana das leishmanias, inibindo a sua síntese criando poros levando à morte do parasita. Os lipossomas transportam o fármaco até ao local de infecção.	Muitos efeitos secundários relacionados com a ligação desta droga ao colesterol das células do próprio hospedeiro e nefrotóxicidade. Em lipossomas existe diminuição da dose medicamentosa, reduzida toxicidade, elevada eficácia mas elevado custo.
Aminosidina - Amminofarma®	Inibidor da síntese proteica podendo ser associado aos antimonias.	Antibiótico - aminoglicosídeo toxicidade renal e nefrotoxicidade.
Derivados do Imidazol	Afinidade para os esteróis da membrana celular das leishmanias inibindo a sua síntese, inibidor de síntese de DNA e provocam depleção das reservas glucogénicas.	Eficácia reduzida
Análogos das purinas – Alopurinol (Zyloric®)	Análogo estrutural da hipoxantina. Inibição das enzimas que realizam a conversão das purinas, logo é um inibidor da síntese de DNA.	Não ajuda na eliminação das infecções assintomáticas .
Trifluralina	Herbicida dinitroanilina que inibe a proliferação dos promastigotas ligando-se à tubulina das leishmanias.	De via parentérica mas com baixa solubilidade .
Miltefosina - Milteforan®	Inibe a síntese da membrana celular do parasita.	Bom para doentes com insuficiência renal e reduzidos efeitos tóxicos.
Imunomoduladores - citocinas e interferões	Imunossuppressores ou imunomoduladores consoante o tipo de resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro.	

### 3.2 Prevenção e profilaxia

O sucesso da prevenção das leishmanioses, passa pelo controlo tanto ao nível dos vectores como dos reservatórios.

A vacinação dos cães seria, no entanto, a melhor estratégia a longo prazo, se uma vacina eficaz pudesse ser desenvolvida (Moreno & Alvar, 2002). A tabela 2 resume alguns estudos realizados no desenvolvimento de potenciais vacinas para a leishmaniose.

**Tabela 2. Sumário de estudos de vacinas anti-leishmania em humanos e em modelos experimentais** (Cabrera *et al.*, 2000; Hadman, 2001; Gradoni *et al.*, 2005).

Antígeno	Modo de imunização (País)	Protecção	Hospedeiro
Promastigotas vivos e mortos	Profilático (Israel) Profilático (Brasil)	Depende da virulência - variável	Humanos
Promastigotas mortos com BCG	Terapêutico (Brasil)	Elevada taxa de cura	Humanos
Promastigotas mortos com BCG	Profilático (Irão)	Nenhuma protecção	Humanos
Promastigotas mortos com adjuvante IL-12	Profilático	Boa	Roedores, primatas não humanos e cães
Promastigotas irradiados	Profilático	Boa	Roedores
Promastigotas vivos atenuados	Profilático	Boa	Roedores
Proteína gp63 recombinante ou nativa e péptidos sintéticos	Profilático	Boa	Roedores, primatas não humanos
Proteína gp46/M2/PSA-2 recombinante ou nativa	Profilático	Excelente mas dependente da conformação e adjuvante utilizado	Roedores
Antígeno flagelar LCR1	Profilático	Boa	Roedores
DNA e gp63, PSA-2 e LACK	Profilático ou terapêutico	Boa	Roedores
Promastigotas <i>L. braziliensis</i> mortos	Profilático	Boa na fase I e mau na fase II*	Cães
Ligando de fucose manose de <i>L. donovani</i> (FML)	Profilático e imunoterapia	Boa na fase III*	Cães
Antígenos secretados por <i>L. infantum</i> - LiESAp	Profilático	Boa na fase I e II*	Cães
Promastigotas mortos de <i>L. major</i> + BCG	Profilático	Boa na fase III*	Cães
Componente antigénico multi quimérico chamado Q (formado por proteínas ribossomais e histonas)	Profilático	Boa na fase I e II*	Cães
Subunidade multi recombinante - MML	Profilático (Itália)	Boa	Roedores

**\*Fase I, II e III** - Um estudo de fase I testa o medicamento pela primeira vez. O objectivo principal é avaliar a segurança do produto investigado. Nesta fase a medicação é testada em pequenos grupos (10 – 30). Na fase II o número de indivíduos que participam é maior (70 - 100). Aqui, o objectivo é avaliar a eficácia da medicação, isto é, se ela funciona para tratar determinada doença, e também obter informações mais detalhadas sobre a segurança (toxicidade). Na fase III, o número de indivíduos aumenta para 100 a 1000. Geralmente, os estudos desta fase são aleatórios, isto é, os indivíduos são divididos em dois grupos: o grupo controlo (recebe o tratamento padrão) e o grupo investigacional (recebe a nova medicação).

As preparações candidatas a vacinas podem ser, parasitas mortos, parasitas vivos mas atenuados, antígenos totais ou fracções antigénicas, péptidos sintéticos, antígenos ou proteínas recombinantes, antígenos não proteicos como é o caso do lipofosfoglicano (LPG), e vacinas de DNA. O desenho de uma vacina tem por objectivo desencadear um determinado tipo de resposta imunitária e induzir memória protectora a longo prazo.

Contudo, no caso de *Leishmania*, é necessário que ocorra a estimulação da imunidade mediada por células. A estimulação da imunidade humoral só por si não confere protecção. No que diz respeito ao controlo dos reservatórios como é o caso do cão doméstico, deve ter-se em conta que o tratamento dos cães infectados não é uma estratégia eficaz, podendo o cão apresentar parasitas disponíveis para a transmissão semanas depois do tratamento (Cavaliero *et al.*, 1999; Kamau *et al.*, 2000) apesar de estarem clinicamente curados.

Um método de prevenção é evitar a exposição do cão às picadas dos flebótomos através do uso de coleiras tratadas com deltametrina (Scalibor® Protector Bands, Intervet International) (Chappuis *et al.*, 2007) ou pulverizá-lo com “spray” repelente (Dowin®, Virbac).

Como não existe uma vacina disponível em corrente utilização para as leishmanioses (à excepção do Brasil), a prevenção desta doença limita-se à aplicação de medidas básicas como não partilhar objectos contaminados com sangue, controlo veterinário regular dos cães, diminuição das populações de vectores e implementação de medidas sanitárias.

#### 4. RELAÇÃO PARASITA/HOSPEDEIRO

O estudo das interacções parasita-hospedeiro e da resposta imunitária à infecção por *Leishmania* tem sido efectuado em vários animais, incluindo primatas não humanos, cães, “hamsters” e murganhos. Destes, o murganho (*Mus musculus*) é o modelo animal mais utilizado, devido à fácil manipulação, vantagens económicas e à diversidade de reagentes disponíveis no mercado para efectuar os estudos. Apesar de apresentar limitações na extrapolação para o Homem.

##### 4.1 Sistema imunitário

O sistema imunitário tem um papel fundamental na defesa contra agentes infecciosos representando o principal obstáculo à entrada de agentes e ocorrência de infecções, associadas a um alto índice de mortalidade (Machado *et al.*, 2004).

Existem dois tipos de resposta imunitária à invasão por agentes infecciosos, a resposta imunitária inata e a resposta imunitária adaptativa.

A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa do organismo contra a infecção por microrganismos. Envolve barreiras anatómicas (pele, superfícies mucosas, etc.), fisiológicas, células fagocíticas e proteínas celulares solúveis (denominadas de complemento).

A destruição dos microrganismos é desempenhada essencialmente por dois tipos de células fagocitárias: os macrófagos que têm origem nos monócitos, e os neutrófilos.

Os macrófagos em ambas as respostas imunológicas desempenham um papel de fagocitar, matar e degradar microrganismos, reconhecem e reagem a agentes patogénicos (imunidade inata) e auxiliam os linfócitos a estabelecer a imunidade adaptativa (Machado *et al.*, 2004).

O neutrófilo é um granulócito mais pequeno que o macrófago, com capacidade fagocitária e microbicida, que migra rapidamente para os locais de infecção e é um dos elementos da primeira linha de defesa da imunidade inata (Machado *et al.*, 2004).

Para além destas duas células fagocitárias existem também os eosinófilos e os basófilos, também chamados de granulócitos por terem grânulos que contêm substâncias com acção microbicida quando libertadas.

Os leucócitos são células responsáveis por ambas as respostas imunitárias com capacidade de migrar para diferentes locais do corpo e de fornecer células para as duas respostas imunitárias. Entre eles existem: os linfócitos grandes granulares, que são as células “Natural Killer” (NK)<sup>9</sup> que ajudam na imunidade inata e os linfócitos pequenos (células B e T) responsáveis principalmente pelo desenvolvimento da imunidade adaptativa.

A resposta imunitária adaptativa desenvolve estratégias de defesa específicas para cada microrganismo quando a imunidade inata não consegue eliminar os agentes invasores. Reconhece, selecciona e elimina diversos microrganismos e antígenos, ficando com a memória da interacção com o agente. Para além das células B e T, os anticorpos e mediadores celulares solúveis (citocinas) são também elementos principais desta resposta (Santos-Gomes *et al.*, 2008). A resposta imunitária adaptativa é iniciada nos tecidos linfóides como o baço e os gânglios e é dividida em resposta humoral (produção de anticorpos) e resposta celular (células T).

A resposta humoral envolve o reconhecimento de um agente invasor pelas células B. As células B diferenciam-se em plasmócitos que por sua vez produzem os respectivos anticorpos, imunoglobulinas (Ig), que são libertadas. As imunoglobulinas dividem-se em cinco classes, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM e ligam-se especificamente a diferentes antígenos.

A imunidade celular envolve as células T que têm papéis distintos no sistema imunitário. Estas células interagem com células infectadas com o microrganismo (ex: macrófagos) e com outras células do sistema imunitário através da produção e libertação de diferentes tipos de citocinas, que controlam a proliferação, diferenciação e função das células do sistema imunitário que serão envolvidas em processos de inflamação, neuronais e hematopoiéticos, isto é, orquestram a resposta imunitária.

---

<sup>9</sup> **NK** – Chamadas células assassinas naturais, são linfócitos grandes, granulares, citotóxicos e que circulam no sangue. As NK são importantes na imunidade inata contra vírus e outros agentes patogénicos intracelulares.

A expressão de exclusiva de glicoproteínas de superfície CD4<sup>10</sup> e CD8, distingue duas classes de células T: as células T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) e as células T citotóxicas (CD8<sup>+</sup>).

As células TCD8<sup>+</sup> têm função citotóxica, exercendo a sua acção na lise da membrana das células infectadas intracelularmente, e de acordo com as citocinas que segregam desencadeiam respostas imunitárias do tipo Tc1 ou Tc2.

As células TCD4<sup>+</sup> segregam citocinas para activar outros tipos de células e reconhecem células que apresentam na sua superfície celular antígenos de agentes patogénicos ligados a moléculas MHC<sup>11</sup>. As células TCD4<sup>+</sup> podem dividir-se em células T *helper* do tipo 1 (Th1) e do tipo 2 (Th2), de acordo com as citocinas que segregam. As células do tipo Th1 segregam citocinas como o interferão (IFN) - $\gamma$  e a Interleucina (IL) -2, que activam principalmente os macrófagos. As células Th2 segregam IL-4 e IL-10 que ajudam as células B a produzir os anticorpos.

Quando bem sucedida, a resposta adaptativa termina a infecção e fornece imunidade protectora duradoura contra o patogéneo. Falhas no desenvolvimento de uma resposta imunitária bem sucedida pode ser consequência das características hereditárias ou dever-se às estratégias desenvolvidas pelo patogéneo para escapar, evitar ou subverter a resposta imunitária conduzindo ao estabelecimento de infecções crónicas ou à morte.

As citocinas são pequenas moléculas proteicas rapidamente sintetizadas e segregadas por diferentes células do sistema imunitário após estimulação. Têm papéis importantes em muitas respostas incluindo a resposta imunitária, hematopoiese, neurogenese, embriogenese e oncogénese. Frequentemente afectam a acção de outras citocinas de forma aditiva, sinérgica ou antagonista. As citocinas têm sido classificadas com base nas suas respostas biológicas em citocinas pró ou anti-inflamatórias, dependendo dos seus efeitos imunitários. As principais citocinas incluem as interleucinas, interferões e outros factores como o factor de necrose tumoral (TNF) e o factor transformador de crescimento (TGF). As citocinas regulam a resposta imunitária celular e interagem com linfócitos, monócitos, macrófagos, e, para algumas citocinas, também fibroblastos, neutrófilos, células endoteliais ou mastócitos (Parham, 2000).

### 4.2 Imunidade na leishmaniose

A invasão do hospedeiro por *Leishmania* envolve componentes da imunidade inata e adaptativa, bem como, de resposta imunitária humoral e celular. Na infecção por *Leishmania infantum*, mostrou-se que a imunidade inata tem um papel crucial no controlo da

---

<sup>10</sup> **CD** – Significa classe de diferenciação e refere-se a um conjunto de moléculas que se expressam à superfície da célula e estão associadas à fase de desenvolvimento e à actividade exercida pela célula.

<sup>11</sup> **MHC** – É o complexo de histocompatibilidade é um conjunto de genes que codificam proteínas que são expressas à superfície celular apresentando tanto os próprios antígenos como os de microrganismos invasores, para um tipo de célula T com capacidade de destruir os patogéneos e as células infectadas.

disseminação do parasita, e, as primeiras células a surgir no local de infecção são os neutrófilos, dando início à fagocitose dos promastigotas, seguidos pelos macrófagos (Santos-Gomes *et al.*, 2002).

Sendo o parasita obrigatoriamente intracelular o seu primeiro alvo são os fagócitos. Porém o controlo da infecção está associado à destruição intracelular dos amastigotas pelos macrófagos, pela activação das células NK e pelos linfócitos T (Santos-Gomes *et al.*, 2008).

Os macrófagos possuem várias acções antimicrobianas, mas o principal mecanismo leishmanicida é a respiração oxidativa que leva à produção de óxido nítrico (NO), (Santos-Gomes *et al.*, 2008). Verificou-se que a produção de NO está dependente da produção de IFN- $\gamma$  e do TNF- $\alpha$  (Liew *et al.*, 1990). Apesar dos macrófagos serem células especializadas na fagocitose e destruição de agentes patogénicos, *Leishmania* possui um conjunto de estratégias que permitem, não só, alterar a produção de citocinas importantes para uma resposta protectora, mas também contrariar a actividade dos macrófagos e resistir ao sistema imunitário do hospedeiro.

O estabelecimento da infecção processa-se em três etapas principais: i. reconhecimento e entrada de *Leishmania* no macrófago, resistindo às componentes citotóxicas do soro; ii. sobrevivência e multiplicação de *Leishmania* dentro dos fagolisossomas dos macrófagos; iii. modulação da resposta imunitária mediada pelos linfócitos T (Hadman & Bullen, 2002).

Todas as espécies e estirpes de *Leishmania* estudadas até ao momento activam o complemento<sup>12</sup>, e esta activação resulta no aumento da internalização dos parasitas no macrófago (Rosa, 2005), assegurando a sobrevivência do parasita.

Para além da imunidade inata, a infecção por *Leishmania* pode desencadear dois tipos de imunidade adaptativa associadas à actividade dos linfócitos: a resposta humoral (anticorpos), associada à susceptibilidade à doença, e a resposta celular que preferencialmente promove a resistência à infecção.

Na resposta humoral, elevados valores de anticorpos não impedem a progressão da doença e estão associados a uma diminuição da imunidade celular (Rosa, 2005). A elevada produção de imunoglobulinas favorece o parasita, porque parece facilitar a sua internalização nos macrófagos, e no caso dos cães contribuem para a patologia, como é o caso da insuficiência renal que é promovida pela deposição de anticorpos ao nível dos rins (Santos-Gomes *et al.*, 2008).

A evolução da leishmaniose é determinada pela resposta celular que está dependente dos linfócitos T orquestrarem uma resposta imunitária adequada.

---

<sup>12</sup> **Complemento** – É um sistema denominado de complemento, composto por proteínas da membrana plasmática e solúveis no sangue. Estas proteínas reagem entre elas para opsonizar os patógenos e induzir uma série de respostas inflamatórias que auxiliam no combate à infecção. Inúmeras proteínas do complemento são proteases que se auto-activam por clivagem proteolítica.

A resistência ou a susceptibilidade à infecção depende da capacidade dos linfócitos se diferenciarem em células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, bem como do predomínio das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th1, Th2 ou Th3 (Santos-Gomes *et al.*, 2008).

A maioria dos estudos realizados associa a resposta Th1 ao controlo da infecção, enquanto que o desenvolvimento de uma resposta Th2 está associada ao desenvolvimento incontrolado da doença (Pereira, 2003; Rosa, 2005; Santos-Gomes *et al.*, 2008). A resposta Th3 é imunoregulatória e está associada às células T reguladoras (Treg), que apesar de contribuírem para a supressão de algumas citocinas e patologias da doença, permite a manutenção da infecção crónica.

Para o desenvolvimento de uma resposta precoce Th1, é necessária a produção da citocina IL-12 por macrófagos activados e células dendríticas para promover, não só, a expansão das células Th1, mas também, a indução da produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK.

Posteriormente, as células Th1 produzem IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  que desempenham um papel importante no controlo da infecção, agindo sinergisticamente com o IFN- $\gamma$  na activação dos macrófagos para a produção da enzima indutora de óxido nítrico (iNOS), promovendo a destruição do parasita (Santos-Gomes *et al.*, 2008).

Já a citocina IL-4 direcciona o desenvolvimento clonal da subpopulação Th2 que produz IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, contribuindo para a desactivação dos macrófagos e desenvolvimento da resposta humoral que leva à progressão da doença.

A citocina anti-inflamatória IL-10 é produzida por uma sub-população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> reguladores (T<sub>reg</sub> (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>)) e está relacionada com a regulação da magnitude da resposta imunitária, promovendo a supressão da actividade das células efectoras. A regulação da resposta efectora é importante para a manutenção da homeostasia imunológica, mas favorece a sobrevivência do parasita, contribuindo para o estabelecimento da infecção (Rodrigues *et al.*, 2009).

A resposta do tipo Th3 é caracterizada pela produção de TGF- $\beta$  que também contribui para a regulação das respostas imunitárias pró-inflamatórias.

A resistência à leishmaniose visceral tem sido associada por inúmeros cientistas à activação das células Th1 que produzem IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  (Goto & Lindoso, 2004). Por outro lado, o papel das citocinas da resposta Th2, como IL-4 e IL-10, nos animais sintomáticos ainda é controverso, havendo cada vez mais evidências que apontam para uma correlação entre estas citocinas e a doença progressiva. As células TCD8<sup>+</sup> citotóxicas parecem também estar envolvidas na resistência à leishmaniose visceral (Goto & Lindoso, 2004).



## II. OBJECTIVOS GERAIS – ESTUDOS DA RESPOSTA IMUNITÁRIA

Este trabalho teve como objectivo geral, compreender a resposta imunitária celular desenvolvida durante a infecção por *Leishmania sp. ex vivo*, no modelo animal experimental mais comumente utilizado - o murganho (*Mus musculus*).

As respostas imunológicas foram estudadas para avaliar a capacidade terapêutica de novos compostos químicos no tratamento da leishmaniose e o efeito imunoprotector de potenciais vacinas.

De um modo geral, os estudos focaram-se no conhecimento da resposta imunitária celular, ou seja naquela que é mediada por células durante a imunidade adaptativa. A resposta imunitária celular foi avaliada pela análise do padrão de citocinas expressas e produzidas pelos linfócitos TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, relacionada com a carga parasitária presente em órgãos onde a *Leishmania* se multiplica (baço, fígado, gânglios e pele) consoante a espécie infectante de *Leishmania*.

O conhecimento do padrão de citocinas expressa pelas células T nos órgãos linfóides, permite-nos identificar o tipo de resposta (Th1, Th2, Th3, Tc1 ou Tc2) que está a ser desenvolvida e juntamente com a determinação da carga parasitária, avaliar o grau de protecção dos murganhos após vacinação ou redução/eliminação da infecção após tratamento.

Esta dissertação foi organizada em três capítulos diferentes, cada um com objectivos específicos, e orientados no seu conjunto para a compreensão da resposta imunitária celular:

1. Estudo da actividade terapêutica de compostos químicos – Este estudo teve por objectivo, caracterizar através do tipo de resposta imunitária desenvolvida, o efeito terapêutico de novos compostos sintéticos no tratamento de murganhos infectados com *L. infantum* (Cap. III).
2. Estudo de vacinas para a leishmaniose cutânea do Novo Mundo – Neste trabalho pretendeu-se avaliar a capacidade imunoprotectora (vacinação) de fracções proteicas libertadas por promastigotas de *Leishmania shawi* após a infecção de murganhos (Cap. IV).
3. Estudo de vacinas para a leishmaniose visceral zoonótica - Teve por finalidade determinar o grau de protecção/imunização (vacinação) de duas proteínas recombinantes de *Leishmania infantum* (Cap. V).

## III. ACTIVIDADE TERAPÊUTICA DE NOVOS COMPOSTOS SINTÉTICOS NA INFECÇÃO POR *L. INFANTUM*

### 1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

A dificuldade de se realizar um tratamento eficaz para a leishmaniose, com baixa toxicidade, com reduzida dose medicamentosa e ausência de resistência e o facto de não existir uma vacina disponível (à excepção do Brasil), implica que a pesquisa de novos compostos com actividade leishmanicida, com boa tolerância e acessíveis aos doentes seja fundamental.

A Trifluralina (TFL) é uma dinitroanilina activa *in vitro* e *in vivo* contra *Leishmania*, com acção na leishmaniose cutânea e visceral (Chan & Fong, 1990; Bhattacharya *et al.*, 2002). As dinitroanilinas ligam-se com elevada afinidade às tubulinas que são o principal constituinte dos microtúbulos das leishmanias, inibindo assim a multiplicação e diferenciação do parasita (Yakovich *et al.*, 2006; Marques *et al.*, 2007). Por outro lado têm a vantagem de não terem qualquer efeito nos microtúbulos dos mamíferos (Morejohn *et al.*, 1987; Chan & Fong, 1990; Carvalheiro *et al.*, 2009).

Este fármaco tem uma baixa solubilidade em água (0,22 mg/l) e, conseqüentemente, torna-se necessário administrar grandes volumes de solventes aquosos ou solventes que não são compatíveis com a administração parentérica, para chegar à dose terapêutica. A estratégia para superar estas dificuldades e aumentar a actividade terapêutica da TFL é a sua incorporação em lipossomas<sup>13</sup> (Cruz *et al.*, 2005; Carvalheiro *et al.*, 2009). Os lipossomas podem ser transportadores adequados para incorporar este composto leishmanicida, pois, após a administração intravenosa, eles são preferencialmente englobados pelos macrófagos do fígado e baço, diminuindo os efeitos secundários e incrementando a eficácia do fármaco. Foram então sintetizados os derivados da trifluralina: **TFL6** 4-(2,6-Dinitro-4-trifluorometil-fenilamina)-fenol e **TFL7** 2-(2,6-Dinitro-4-trifluorometil-fenil-butilamina)-etanol), numa forma livre e incorporados em lipossomas, com o objectivo de avaliar a eficácia terapêutica no tratamento da leishmaniose visceral murina, através da determinação da carga parasitária e da avaliação da resposta imunitária celular.

### 2. MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1. Animais e parasitas

Neste trabalho foram utilizados no total 30 murganhos (*Mus musculus*) fêmeas com cinco a seis semanas de idade, pertencentes à estirpe BALB/c, divididos em três grupos de cinco

---

<sup>13</sup> **Lipossomas** – São associações de natureza coloidal de lípidos anfipáticos, que se organizam espontaneamente em bicamadas concêntricas, asseguram a incorporação de um compartimento aquoso no interior das mesmas, tornando-os um sistema de transporte versátil para agentes hidrofílicos, hidrofóbicos e anfipáticos. Estes sistemas podem ser utilizados para o transporte e direccionamento de fármacos.

animais, para cada composto químico. Os animais foram adquiridos no IHMT e alojados no biotério de acordo com os requisitos da UE (86/609/CEE), reconhecido pela lei Portuguesa (DR DL129/92 e Portaria 1005/92).

Os três grupos de animais definidos para cada composto foram os seguintes: 1. infectados **(controlo)**, 2. infectados e tratados com o composto livre **(TFL6 e TFL7)**, 3. infectados e tratados com o composto em lipossomas **(TFL6LIP e TFL7LIP)**.

A estirpe utilizada para infectar foi *L. infantum* MON-1 (MHOM/PT/89/IMT151) mantida por passagens sucessivas em murganhos BALB/c. Os baços destes murganhos infectados foram homogeneizados para isolamento dos amastigotas do parasita, que foram colocados posteriormente em cultura em meio Schneider (SCH, Sigma, Alemanha) suplementado com 20% (v/v) de soro fetal de bovino (FBS, Sigma, previamente inactivado 30 minutos a 56°C), penicilina (100U/ml) e estreptomicina (100 ug/ml), e incubados a 24°C.

Após a cultura, estes amastigotas transformaram-se em promastigotas infecciosos que foram recolhidos por centrifugação para a infecção dos animais. Aqui, apenas foram utilizados promastigotas provenientes de culturas com menos de cinco subculturas, uma vez que perdem a capacidade infectante após esse período (Santos-Gomes & Abranches, 1996). Em seguida, foi efectuada a contagem do número de promastigotas por ml de cultura por microscopia óptica em câmara de “Neubauer”, sendo a concentração calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Nº Promastigotas/ml} = \text{Nº de parasitas nos 5 quadrados menores da grelha} \times 50 \times \text{FD} \times 10^3$$

(FD - factor de diluição)

#### 2.2. Infecção

Após a obtenção das culturas de promastigotas infecciosos, estas foram centrifugadas 10 minutos a 370 g, e o sobrenadante ressuspendido em soro fisiológico. Cada murganho foi infectado intraperitonealmente (com seringa estéril) com um inóculo de 100 µl de promastigotas infecciosos de *L. infantum* com uma concentração de  $1 \times 10^7$ .

#### 2.3. Tratamento

O tratamento foi realizado, 45 dias após a infecção (tempo necessário para que se estabeleça a infecção), nos animais dos grupos infectados e tratados com o composto livre e com o composto lipossomal<sup>14</sup>, durante 15 dias consecutivos. O tratamento consistiu numa injeção intraperitoneal diária com uma dose de 25 mg do composto por kg de animal. A solubilização destes compostos foi feita em tampão citrato com trealose e 5% de Tween 20. O volume das doses foi de 200 µl por ratinho.

---

<sup>14</sup> Todos os compostos químicos como as suas respectivas formulações foram gentilmente cedidos pela Doutora Eugénia Cruz da Unidade de Novas Formas de Agentes Bioactivos, Departamento de Biotecnologia, Instituto Nacional de Engenharia Tecnologia e Inovação (INETI).

#### 2.4 Determinação da carga parasitária

Três dias após o último tratamento com o respectivo composto químico, os murganhos de cada um dos três grupos (infectados; TFL6 e TFL7; TFL6LIP e TFL7LIP) foram sacrificados e os baços e fígados de cada um minuciosamente recolhidos.

A carga parasitária no baço dos animais infectados contribui para determinar o grau de susceptibilidade/resistência à infecção. O método da diluição limite (LDA) é um exame parasitológico que permite estimar o número de parasitas viáveis presentes num órgão.

Foi efectuado um homogeneizado do baço de cada um dos cinco animais de cada grupo em 4 ml de SCH com 10% FBS com o auxílio de homogeneizadores “medicons” (Miltenyi Biotec, Alemanha). Posteriormente foi realizada uma diluição de 1:2 desse homogeneizado.

Numa placa de 96 poços de fundo redondo (Nunc, Thermo Fisher Cientific, Dinamarca) foi adicionado 150 µl de meio SCH com 10% de FBS a todos os poços excepto nos poços da primeira coluna. Em quatro poços da primeira coluna (consistem em quatro réplicas) foi adicionado 200 µl da diluição do homogeneizado de cada baço, e a partir desses efectuaram-se diluições sucessivas de 1:3 até à última coluna, a placa foi incubada durante 15 dias a 24°C.

Após os 15 dias, é feita uma observação por microscopia óptica de 10 µl de cada poço e registada a presença de promastigotas. A diluição mais elevada em que se observe pelo menos um promastigota foi considerada a diluição limite e utilizada no cálculo da carga parasitária (Rodrigues *et al.*, 2009) de acordo com a fórmula seguinte:

$$\text{Nº de parasitas viáveis/g de baço} = [(4^A \times 3 \text{ ml}) / (0,2 \times 2)] / \text{peso do órgão (g)}$$

(A – última diluição positiva; 3 ml – volume do homogeneizado; 0,2 – volume do poço da placa; 2 – factor de diluição do homogeneizado)

#### 2.5 Avaliação do padrão expresso de citocinas por PCR em tempo real

O RNA total foi extraído dos homogeneizados do baço e do fígado de cada um dos cinco animais de cada grupo. As amostras foram previamente armazenadas a -80°C em tampão de lise [0,5 ml GITC (guanidina isotiocionato, Qiagen, Alemanha), mercaptoetanol 1% (v/v)]. De forma a evitar a degradação do RNA pelas ribonucleases todo o material e reagentes foi tratado com água DEPC 0,1% (dietilpirocarbonato, Sigma). A extracção e o tratamento do RNA foram feitos de acordo com as instruções do fornecedor do “kit” utilizado (RNeasy Mini Kit; Qiagen).

Uma vez que a expressão génica do RNA foi sempre normalizada em relação a um gene constitutivo (“housekeeping gene”) “hypoxantine-guanine phosphoribozyl transferase” (HPRT) a sua quantificação não foi necessária.

O RNA extraído foi transcrito por transcrição reversa (RT) em cDNA. Utilizaram-se 16,5 µl de RNA de cada amostra juntamente com 1 µl de 200U da enzima transcriptase reversa (M-MLVRT – “Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase”; Promega, EUA) em tampão de reacção, a 37°C durante 60 minutos. O tampão de reacção foi constituído por amostra por: 1,5 µl dNTPs (10 mM) (Bioline), 1 µl Oligo (dT)<sub>15</sub> (1:10) (Promega), 3 µl de BSA (10 mM) (Promega), 1 µl RNasin (40U) (Promega) e 6 µl de tampão 3 mM 5x “First strand Buffer” (GibcoBRL). As amostras foram previamente aquecidas a 95°C, 10 min para inactivação da transcriptase reversa e arrefecidas a 4°C. Para cada reacção feita, foi utilizado um controlo negativo (amostra sem RNA).

O RNA mensageiro (mRNA) dos genes IL-12, IFN-γ, IL-10, IL-4, TNF-α, IL-17 foi quantificado usando o método de quantificação que elimina as diferenças inerentes à fase estacionária de amplificação em que os componentes se tornam limitantes para a reacção. Para a quantificação foram utilizados padrões de cDNA plasmídico para cada citocina e para o HPRT obtidos através de clonagem de cada gene. Fizeram-se diluições sucessivas dos plasmídios respectivos 10 e/ou 5 vezes de forma a construir uma curva padrão para cada citocina e HPRT numa reacção de PCR em tempo real. As amplificações de PCR foram efectuadas usando SYBR Green, como flurocromo específico para cadeias duplas de DNA, com contínua monitorização da emissão de fluorescência. A amplificação foi realizada num volume total de 20 µl contendo: 2 µl de cDNA da amostra, 10 µl de 2x SYBR Green I dye PCR Master (Applied Biosystems, Reino Unido) e as sequências iniciadoras (“primers”) em água ultra-pura, numa concentração de 300 nM para os “primers” 3’-5’ (“forward”) e 5’-3’ (“reverse”) (Rodrigues *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2007). As sequências dos “primers” para os genes das citocinas analisados e para o gene HPRT encontram-se indicadas na tabela 3.

As condições utilizadas para a amplificação foram 10 min a 95°C para activação da AmpliTaqGold DNA polimerase, seguida de 40 ciclos a três temperaturas (15 segundos a 94°C para desnaturação, 1 minuto a 60°C para ligação dos “primers” e 30 segundos a 72°C para extensão). O PCR foi realizado no sistema ABI GeneAmp 5700 (Perkin Elmer/Applied Biosystems, EUA) e as condições de reacção definidas num Pentium III Dell Opti Plex GX110 ligado ao sistema de detecção óptico.

A quantidade de cada citocina obtida de cada gene-alvo foi utilizada no cálculo do número de cópias das citocinas em estudo. A expressão de mRNA de cada citocina foi normalizada relativamente à expressão do HPRT e apresentada em número de cópias de cada citocina por 1000 cópias de HPRT pelo programa utilizado foi o GeneAmp 5700 “sequence detection system” versão 1.3. O número de cópias foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Nº de cópias de mRNA} = \frac{9,1 \times 10^{11} \times \text{quantidade da citocina em mg}}{(3015 + \text{comprimento em pares de bases do produto amplificado})/10000}$$

**Tabela 3. Sequências dos “primers forward” (FWD) e “reverse” (REV) dos genes analisados**

Genes alvo	Sequência	Comprimento (pares de base)
HPRT	Primer FWD: 5' GCTCGAGATGTCATGAAGGAGAT 3' Primer REV: 5' CCAGCAGGTCAGCAAAGAACT 3'	91
IL-12	Primer FWD: 5' AGACCCTGCCCATTGAACTG 3' Primer REV: 5' AAGAAGCTGGTGCTGTAGTTCTCA 3'	73
IFN- $\gamma$	Primer FWD: 5' CAATGAACGCTACACACTGCATC 3' Primer REV: 5' CGTGGCAGTAACAGCCAGAA 3'	72
IL-10	Primer FWD: 5' CAAGGCAGCCTTGCAGAAA 3' Primer REV: 5' CAGTAAGAGCAGGCAGCATAGC 3'	71
IL-4	Primer FWD: 5' GACGCCATGCACGGAGAT 3' Primer REV: 5'GCCCTACAGACGAGCTCACTCT3'	81
TNF- $\alpha$	Primer FWD: 5' CACCTGCAAGACCATCGACAT 3' Primer REV: 5' ACAGGATCTGGCCACGGAT 3'	73
IL-17	Primer FWD: 5'-GGT CAA CCT CAA AGT CTT TAA CTC-3' Primer REV: 5'-TTA AAA ATG CAA GTA AGT TTG CTG-3'	142

## 2.6. Análise estatística

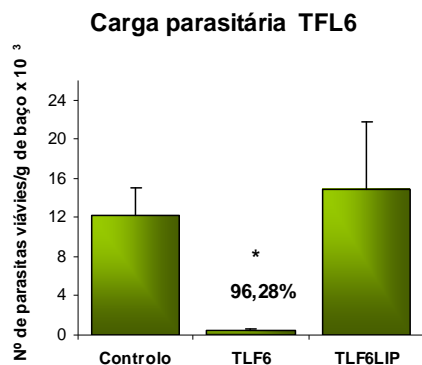
Esta experiência foi no total, repetida três vezes e a média e o desvio padrão dos valores obtidos apresentados nos gráficos (Fig. 2, 3 e 4). A análise estatística foi realizada através do teste não-paramétrico Mann-Whitney para duas variáveis independentes. Os valores obtidos da carga parasitária e da expressão do mRNA das diferentes citocinas dos grupos de murganhos tratados (TFL6 e TLF7, TFL6LIP e TLF7LIP), foram comparados com os valores obtidos no grupo de murganhos infectados (controlo). Para esta análise utilizou-se o programa “Statistical Package for Social Sciences” 17.0 (SPSS, Inc., USA). As diferenças observadas foram consideradas significativas para um nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ ).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Carga parasitária após o tratamento

O grupo de murganhos **2. TLF6** após estar 45 dias infectado com *L. infantum* apresentou uma carga parasitária média de  $0,450 \times 10^3$  promastigotas/g de baço, enquanto que o grupo **1. controlo** apresentou uma carga parasitária de  $12,3 \times 10^3$  promastigotas/g de baço. Portanto, o composto na forma livre induziu uma redução significativa da carga parasitária de 96,28% ( $p_{TFL6}=0,026$ ) (Fig. 2).

Ao contrário do que seria esperado, o grupo de murganhos **3. TFL6LIP**, apresentou uma carga parasitária de  $14,9 \times 10^3$  promastigotas/g de baço, semelhante ao grupo **1. controlo** e superior ao **TFL6**.



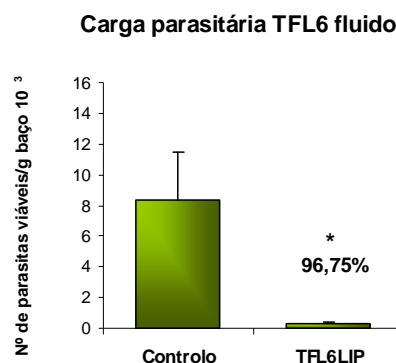
**Figura 2. Valores da carga parasitária do TFL6.** Murganhos infectados (controlo), infectados e tratados com TFL6 e infectados e tratados com TFL6LIP.  
\* Indica diferenças significativas

Uma vez que, o composto integrado num lipossoma não teve melhor eficácia que o composto na sua forma livre (que se sabe ser tóxico), considerou-se a hipótese de que eventualmente o lipossoma não deixou libertar o composto numa concentração suficientemente elevada para eliminar os parasitas. Assim, realizou-se uma pequena experiência teste para comprovar esta hipótese, que consistiu na incorporação do TLF6 numa nova forma lipossomal mais fluida (TLF6LIPf), libertando mais facilmente o composto nos órgãos alvo. Para tal, novos grupos de murganhos foram infectados com *L. infantum* (45 dias) e tratados com a nova formulação.

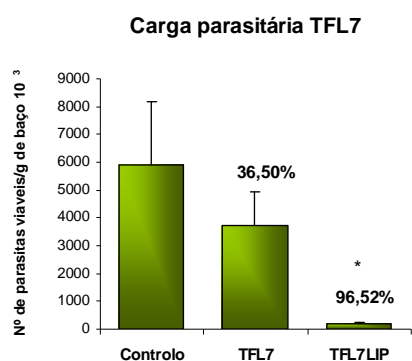
Os resultados apesar de preliminares parecem confirmar esta hipótese (Fig. 3), pois o grupo de murganhos tratados com este composto incorporado em lipossomas mais fluidos mostrou uma redução da carga parasitária de 96,75% (0,270 x 10<sup>3</sup> promastigotas/g de baço) relativamente ao grupo controlo (8,40 x 10<sup>3</sup> promastigotas/g de baço).

Futuramente, estudos de tratamento com o composto TLF6, serão repetidos em murganhos com esta nova formulação lipossomal mais fluida, de forma a avaliar melhor a sua capacidade terapêutica, juntamente com a avaliação da resposta imunitária desenvolvida.

Ao contrário dos tratamentos com o composto TFL6LIP, os tratamentos efectuados com o composto TLF7 (Fig. 4) mostraram que o grupo **3.TLF7LIP** apresentou



**Figura 3. Valores da carga parasitária do TFL6LIP mais fluido.** Murganhos infectados (controlo), infectados e tratados com TFL6LIP mais fluido.



**Figura 4. Valores da carga parasitária do TFL7.** Murganhos infectados (controlo), infectados e tratados com TFL7 e infectados e tratados com TFL7LIP.  
\* Indica diferenças significativas

uma redução da carga parasitária de 96,52% relativamente ao grupo **1. controlo** ( $p_{\text{TFL7}}=0,023$ ) (2,02 x 10<sup>5</sup> e 5,89 x 10<sup>6</sup> promastigotas/g de baço, respectivamente).

No grupo **2.TFL7** foi estimada uma carga parasitária de 3,74 x 10<sup>6</sup> promastigotas/g de baço, apresentando uma redução da carga parasitária de 36,50%, mas sem significado estatístico relativamente ao grupo **1. controlo**. Este facto, aponta para uma reduzida actividade

leishmanicida.

Estes resultados sugerem que a formulação sintética constituída pelo composto TLF7 incorporado em lipossoma (TFL7LIP), tem uma boa actividade terapêutica e pode ser considerada uma formulação candidata ao tratamento da leishmaniose visceral causada por *L. infantum*. No entanto, é importante complementar estes resultados, tanto do TLF6 na formulação lipídica mais fluida como do TLF7, com a avaliação da resposta imunitária desencadeada pelo hospedeiro.

#### 3.2 Citocinas expressas no murganho após o tratamento

##### TFL6

Este estudo teve como objectivo investigar o padrão expresso de citocinas *ex vivo* no baço e no fígado dos murganhos, de forma a avaliar se o tratamento ou a diminuição da carga parasitária induziu alterações ao nível da resposta celular do hospedeiro.

No baço, a expressão de IL-12 sofreu uma redução significativa tanto no grupo de animais tratados com o composto TLF6 na forma livre (TFL6) como na forma lipossomal (TFL6LIP) ( $p_{TFL6}=0,011$  e  $p_{TFL6LIP}=0,002$ ) relativamente ao grupo controlo (Fig. 5). Uma vez que a IL-12 está associada à resposta do tipo Th1 e, indirectamente á activação dos macrófagos (Parham, 2000), a sua redução pode estar a limitar, não só, o desenvolvimento de uma resposta inflamatória no hospedeiro, mas também eventualmente, privilegiar a sobrevivência do parasita (Fiorentino *et al.*, 1989).

Apesar de não terem existido alterações estatisticamente significativas na expressão das outras citocinas, de um modo geral, verificámos que nos grupos tratados há uma tendência para a diminuição dos níveis de todas as citocinas, com excepção da IL-4.

A IL-4 que caracteriza a resposta Th2 restringe a acção dos macrófagos na eliminação dos parasitas (Oswald *et al.*, 1992).

As citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$  são expressas em pequenas quantidades, atenuando a actividade leishmanicida dos macrófagos e acentuando uma leve recuperação da resposta Th2 que pode contribuir para a diminuição da IL-12 observada (Powrie & Coffman, 1993; Sedlik, 1996).

A expressão de IL-17 é muito reduzida (ausência de resposta Th17) tanto nos animais infectados como nos animais tratados sugerindo não haver qualquer tipo de relação entre a expressão desta citocina e a severidade da infecção, reforçando a inibição da actividade macrófagica (Ferretti *et al.*, 2003).

Assim, no baço, parece ter existido uma resposta mista Th1/Th2, com expressão de IFN- $\gamma$  e IL-4 semelhante à resposta presente no grupo controlo (infectado) que conduz possivelmente à manutenção da infecção.



No fígado, os grupos tratados apresentaram uma leve acentuação da resposta Th1 com a diminuição da expressão de IL-4. Estando esta citocina associada à resposta Th2 e à supressão da resposta Th1, explica o facto de ter havido uma tendência para o aumento da expressão de IL-12 e IFN- $\gamma$ .

Nestes animais ocorre também uma considerável expressão de IL-10 que está associada à regulação da homeostasia imunológica, podendo inibir a actividade das células efectoras (Bhattacharya et al., 2001; Kane & Mosser, 2001). De facto o aumento da expressão de IL-10 associado à diminuição de IL-4 aponta para uma resposta T reguladora associada à proliferação da população de células T reguladoras ( $T_{reg}$ ,  $CD4^+CD25^+$ ). A resposta  $T_{reg}$ , induz a redução das células efectoras, procurando atingir a homeostasia imunológica, evitando respostas imunológicas intensas que possam vir a ser prejudiciais para o hospedeiro. Mas por outro lado, o desenvolvimento das  $T_{reg}$  e a desactivação das células efectoras tem como consequência a manutenção da infecção (Rodrigues *et al.*, 2009). Também neste órgão os valores de IL-17 são reduzidos nos animais infectados e nos animais tratados reforçando a ideia de não haver relação entre a expressão desta citocina e a severidade da infecção.

No seu conjunto estes resultados sugerem que as formulações do composto TLF6 conseguiriam reduzir a carga parasitária do baço sem que a resposta imunitária celular sofresse alterações significativas, uma vez que, os animais tratados apresentaram um padrão de citocinas semelhante ao desenvolvido pelo grupo infectado, levando à manutenção da infecção crónica, pela atenuação da actividade leishmanicida dos macrófagos (Kane & Mosser, 2001).

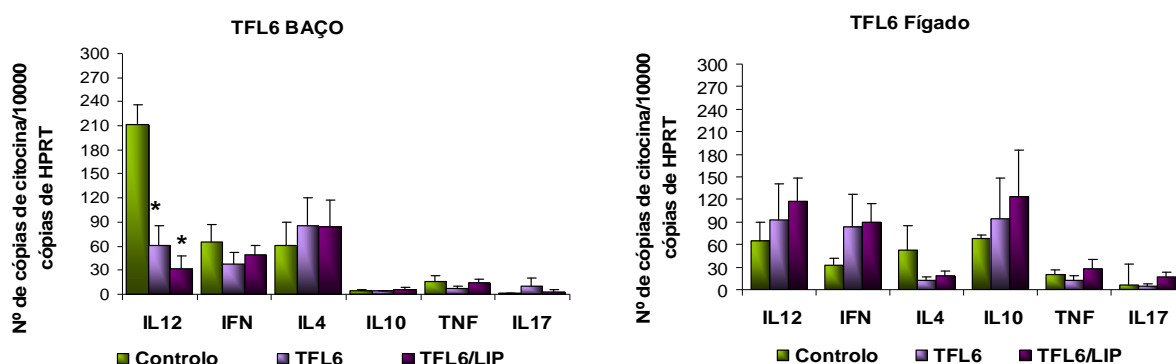


Figura 5. Nº de cópias de citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-17 por 1000 cópias de HPRT, no baço e fígado de murganinhos infectados e tratados com o composto químico TLF6 na forma livre e lipossomal. \* Indica diferença significativa entre os diferentes grupos tratados.

#### TFL7

Relativamente ao tratamento com o TFL7 os resultados obtidos sugerem o desenvolvimento de uma resposta imunitária específica em cada órgão, relativamente ao padrão e à intensidade de expressão das citocinas (Fig. 6).

No baço dos animais controlo, a expressão das citocinas apontam para uma resposta mista Th1/Th2, ainda que de baixa intensidade, provavelmente decorrente da elevada carga parasitária. Os animais tratados com o composto TLF7 apresentaram uma significativa redução do número de cópias de IL-12 ( $p_{\text{TLF7}}=0,019$  e  $p_{\text{TLFLIP}}=0,003$ ) em comparação com os animais infectados.

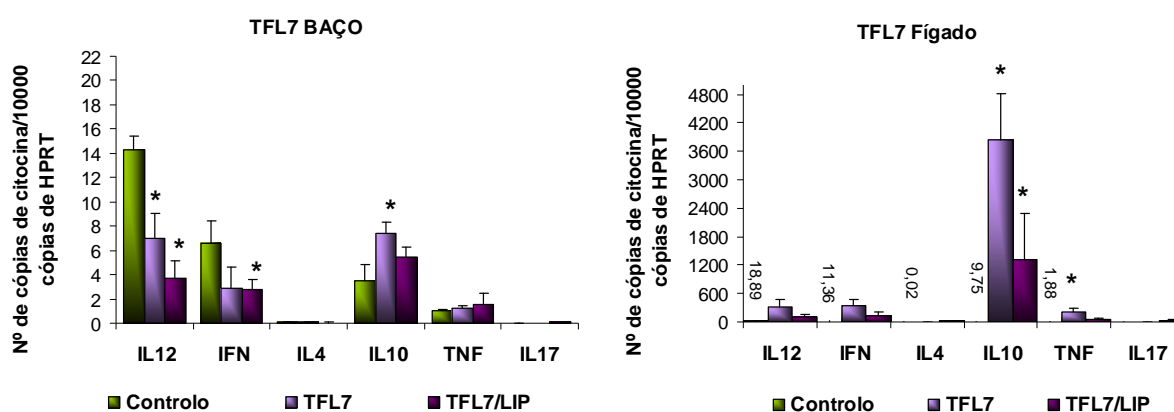
Os animais tratados com as duas formulações de TFL7 apresentaram diminuição da expressão de IFN- $\gamma$ , apesar de, só no composto lipossomal a diferença ser estatisticamente significativa ( $p_{\text{TFL7LIP}}=0,028$ ).

Existe um nítido aumento da expressão de IL-10, tanto nos grupos tratados com a forma livre, como, com a forma lipossomal, mas só o grupo livre apresentou diferença significativa ( $p_{\text{TFL7}}=0,04$ ).

A expressão de IL-4, TNF- $\alpha$  e IL-17 manteve-se inalterável nos grupos tratados e semelhante à do controlo.

A diminuição da expressão de IL-12 e de IFN- $\gamma$  nos grupos experimentalmente tratados, pode estar associada ao aumento da expressão de IL-10, apontando para o predomínio de uma resposta  $T_{\text{reg}}$ , associada à manutenção de uma infecção crónica (Rodrigues *et al.*, 2009). Para além disto, o aumento de IL-10 em conjunto com a diminuição de IL-12 e IFN- $\gamma$  pode ter contribuído para a redução expressão de TNF- $\alpha$ , que está intimamente associado à produção de óxido nítrico, importante para a lise do parasita pelos macrófagos infectados.

A redução da carga parasitária pode ser consequência da actividade citotóxica das células TCD8<sup>+</sup>, induzida pela IL-10, como mostra o estudo de Groux *et al.*, (1999).



**Figura 6. Nº de cópias de citocinas IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-17 por 1000 cópias de HPRT, no baço e fígado de murganinhos infectados e tratados com o composto químico TLF7 na forma livre e lipossomal. \* Indica diferença significativa entre os diferentes grupos tratados. Devido à escala do eixo dos y no gráfico do fígado, os valores para o grupo controlo estão indicados no gráfico.**

No fígado os resultados indicam, igualmente, uma resposta mista Th1/Th2 (Fig. 6).

Contudo, o número de cópias de IL-10 teve um aumento significativo nos animais tratados com o TLF7 livre ou lipossomal ( $p_{\text{TLF7}}=0,002$  e  $p_{\text{TLF7LIP}}=0,01$ ).

O TNF- $\alpha$  também apresentou um aumento significativo nos animais tratados com o composto na forma livre ( $p_{TFL7}=0,016$ ) em relação ao grupo controlo.

O facto da expressão de IL-12 e de IFN- $\gamma$  não ter aumentado de forma significativa pode ser atribuído ao aumento exacerbado de IL-10, que está associado à supressão da actividade das células efectoras. No entanto, a produção de IL-10 não é suficiente para inibir de todo a produção das citocinas típicas da resposta Th1 (IL-12 e IFN- $\gamma$ ), de tal forma que se verifica uma ligeira tendência para o aumento destas, que parecem contribuir para a expressão de TNF- $\alpha$  nos animais tratados com o composto livre (TFL7).

O TNF- $\alpha$  é um factor importante para a activação dos mecanismos de respiração oxidativa dos macrófagos, levando à formação de radicais oxidativos (como o óxido nítrico) que, por sua vez contribuem para a destruição dos parasitas. Mais uma vez a expressão de IL-17 não parece ter qualquer interferência no desenvolvimento de uma resposta imunitária.

Resumindo, estes resultados sugerem que a formulação do composto TFL7 no tratamento de *L. infantum* conseguiu reduzir a carga parasitária do baço, induzindo uma resposta imunitária reguladora devido ao aumento acentuado da expressão de IL-10 (citocina Treg) que leva à manutenção da infecção crónica pela atenuação do IFN- $\gamma$  e da IL-12 (citocinas associadas a uma resposta Th1). A expressão aumentada de TNF- $\alpha$  pode ter sido essencial para a activação dos macrófagos e consequente destruição dos parasitas.

## **IV. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE IMUNOPROTECTORA DE FRACÇÕES PROTEICAS ANTIGÉNICAS LIBERTADAS POR PROMASTIGOTAS DE *L. shawi***

### **1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS**

A leishmaniasis Tegumentar Americana (LTA) permanece endémica em vastas áreas da América Latina, e actualmente, está em expansão na região norte do Brasil. Existem actualmente seis espécies de *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. shawi*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*) responsáveis pela doença humana e mais de 200 espécies de flebótomos implicados na sua transmissão.

No Homem, a apresentação clínica da doença varia entre a leishmaniose cutânea e a leishmaniose mucocutânea (Basano & Camargo, 2004).

A espécie *L. shawi* tem reconhecida importância epidemiológica e é transmitida pelo vector *Lutzomyia whitmani*, tendo como reservatórios principais animais selvagens, como, macacos, preguiças e roedores (Shaw & Lainson, 1975).

Sendo as leishmanioses identificadas pela Organização Mundial de Saúde como a segunda doença parasitária que mais mata no mundo inteiro, revela-se imprescindível apoiar o desenvolvimento de novos tratamentos ou vacinas para estas doenças. Neste sentido

devem ser incentivados, os estudos de antígenos parasitários, que possam conduzir ao desenvolvimento de vacinas eficientes.

Tanto quanto sabemos foram, até ao momento, publicados muito poucos ou quase nenhuns artigos científicos que se debrucem sobre o estudo de proteínas de *L. shawi*. Para além disto, um dos investigadores responsáveis pela caracterização deste protozoário, Passero, F.L. (comunicação pessoal) informou que os antígenos de *L. shawi* são reconhecidos por anticorpos presentes no soro de doentes com LTA causada por outras espécies de *Leishmania*.

Actualmente, estudos imunoprotectores de proteínas secretadas pelo próprio parasita revelam-se mais interessantes e promissores, do que, os estudos de antígenos da superfície do parasita, como revela, por exemplo, o estudo imunoprotector de antígenos libertados por *L. infantum* de Rosa *et al.*, 2007. Estas proteínas tornam-se mais relevantes, não só, porque as proteínas que são libertadas são as primeiras a estabelecer contacto com o hospedeiro, podendo modular as estratégias de evasão e invasão ao seu sistema imunológico, mas também pela capacidade que revelam em induzir protecção.

Todas estas considerações levaram-nos ao estabelecer a hipótese de que antígenos libertados por *L. shawi* possam ser bons candidatos para o desenvolvimento de vacinas que protejam da LTA.

Assim, o presente estudo teve como objectivo, avaliar o papel imunoprotector de três fracções proteicas antigénicas (“High”, “Inter”, “Low”), libertadas por promastigotas de *L. shawi*.

A capacidade imunogénica e protectora de cada fracção proteica foi avaliada *ex vivo* em murganhos BALB/c, através da determinação da carga parasitária e avaliação da resposta imunitária celular desenvolvida (Th1, Th2 ou Th3).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais e parasitas

Neste trabalho foram utilizados 35 fêmeas de murganhos (*Mus musculus*), com cinco a seis semanas de idade, pertencentes à estirpe BALB/c, divididos por três grupos com cinco animais cada um: **1. vacinados e infectados** para cada fracção (High, Inter e Low), **2. vacinados** com cada fracção (High, Inter e Low) e **3. infectados** (controlo).

Os animais foram adquiridos no IHMT e alojados no biotério de acordo com os requisitos da UE (86/609/CEE), reconhecido pela lei Portuguesa (DR DL129/92 e Portaria 1005/92).

Foi utilizado neste estudo para infectar a espécie *L. shawi* (MHOM/BR/96/M15789) isolada de um paciente com leishmaniose cutânea em Buriticupu (Maranhão, Brasil). O parasita foi caracterizado isoenzimaticamente no Instituto Evandro Chagas (Pará, Brasil). Estes

parasitas foram mantidos em murganhos (*Mus musculus*) da linhagem BALB/c através de inoculações subcutâneas nas patas traseiras dos animais, de onde foram isolados os amastigotas por maceração da derme das patas. Posteriormente, esses amastigotas foram colocados em crescimento em cultura, em meio SCH com 20% de FBS (previamente inactivado durante 30 minutos a 56°C) com penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 ug/ml) a 24°C. Após cultura, os amastigotas transformaram-se em promastigotas virulentos que foram recolhidos para infecção dos animais, após a contagem em câmara de Neubauer por microscopia óptica, calculada como descrito no capítulo anterior (Cap. III), no ponto 2.1 (pág. 19).

## 2.2 Imunização e infecção

As fracções proteicas utilizadas na imunização dos ratinhos, foram isoladas de *L. shawi* pelo aluno de Doutoramento Luiz Felipe Domingues Passero (do laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo), segundo o seguinte protocolo: Promastigotas obtidos de culturas em meio SCH foram transferidos para meio RPMI (Sigma, Alemanha) livre de proteínas durante 24 horas a 24°C. Findo este período os sobrenadantes foram recolhidos e duas vezes centrifugados em tubos “centricons” (Amicom Millipore, USA) 20 minutos a 4000 g, a 4°C. Posteriormente os sobrenadantes foram liofilizados e solubilizados em solução fisiológica. As proteínas para vacinação foram quantificadas pelo método de Lowry e uma alíquota (50 µg) submetida a electroforese por SDS-PAGE seguida de electroeluição das principais fracções obtidas em electroforese e que chamámos de “High”, “Inter” e “Low” de acordo com o seu tamanho molecular.

Os animais de dois dos três grupos (grupos 1 e 2) foram imunizados duas vezes, com intervalos semanais, por via subcutânea na pata traseira, com uma única dose de 5 µg/ml de cada uma das fracções proteicas. Sete dias após a última dose procedeu-se à infecção dos animais dos grupos, **1. vacinados e infectados** e **3. infectados**, com um inóculo de 100 µl de promastigotas de *L. shawi* a uma concentração de  $1 \times 10^6$ , subcutaneamente na pata traseira, por ratinho.

Após 30 dias de infecção os animais de todos os grupos foram sacrificados por deslocamento da cervical. Os gânglios linfáticos e os fragmentos da pele das patas dos animais de cada um dos grupos, foram recolhidos.

## 2.3 Determinação da carga parasitária

Os fragmentos da derme das patas foram utilizados para determinar a carga parasitária pela técnica da diluição limite (LDA), e os gânglios para avaliar a expressão de citocinas nas

células TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e células duplamente negativas (dn) CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (dnCD4CD8)<sup>15</sup>, por PCR em tempo real. Os fragmentos da derme das patas dos animais foram homogeneizados em meio SCH 10% FBS e diluídos de 1:2. Nos quatro poços da primeira coluna de uma placa de 96 poços de fundo redondo (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Dinamarca) foram colocados 200 µl dessa diluição. O resto do protocolo foi efectuado de acordo com o descrito no capítulo III deste trabalho (pág. 20) no ponto 2.4, tendo sido a carga parasitária expressa em nº de parasitas viáveis/g de derme.

## 2.4 Isolamento das células TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e dnCD4/CD8

Para avaliação da expressão de citocinas, procedeu-se, inicialmente, ao isolamento e separação das células TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e dnCD4/CD8 dos gânglios de acordo com o seguinte protocolo:

Isolaram-se, por gradiente de densidade, os linfócitos de todos os animais dos três grupos, a partir do homogeneizado dos gânglios.

Após três lavagens do homogeneizado dos gânglios, por centrifugação a 370 g durante 10 minutos e a 4°C, o sedimento foi ressuscitado em 4 ml de meio RPMI (Sigma Aldrich, Alemanha). A suspensão celular foi colocada sobre uma solução de separação de linfócitos (Ficoll, GibcoBRL), numa proporção de 2 ml de suspensão para 4 ml de Ficoll, e centrifugou-se sem travão a 520 g durante 25 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, devido ao gradiente de densidade, formou-se um anel rico em linfócitos na interface. Este anel foi recolhido com o auxílio de uma pipeta e lavado com meio RPMI por centrifugação durante 10 minutos a 370 g, à temperatura ambiente. O sedimento foi ressuscitado em meio RPMI com 10% de FBS e os linfócitos totais quantificados em câmara de Neubauer.

As células TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram então isoladas por separação magnética, através de “microbeads” ligadas a anticorpos monoclonais anti-CD4 e CD8 num sistema MidiMACS (MilteniyBiotec, Alemanha). Para tal, os linfócitos totais foram ressuscitados numa concentração final de 10<sup>7</sup> células por 90 µl de tampão (PBS + 0,5% FBS) com 10 µl “microbeads” anti CD4 e anti CD8. Após 20 min de incubação a 4°C, as células foram lavadas e centrifugadas durante a 370 g, durante 10 minutos a 4°C, ressuscitadas em 3 ml de tampão de eluição e aplicadas a uma coluna sobre um separador magnético. As células dnCD4CD8 foram recolhidas directamente da coluna por eluição, enquanto que as células TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram isoladas por selecção positiva. Após alguns passos de lavagem, a coluna foi removida do separador e as fracções com células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> foram então recolhidas. As células de cada tipo celular foram cultivadas no mínimo em quadruplicado

<sup>15</sup> **Células dnCD4CD8** – esta subpopulação celular é constituída por neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas e células B. Estas células durante a infecção respondem directamente a metabólitos microbianos mas não circulam entre o sangue e a linfa.

com uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/poço (150  $\mu$ l/poço) em placas de 96 poços, utilizando meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos e incubadas 72 h, para posterior extração de RNA.

O RNA total foi extraído das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e dnCD4CD8 de acordo com o protocolo descrito no capítulo III, ponto 2.5 (pág. 20).

Posteriormente, a expressão de mRNA das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , foi quantificada por PCR em tempo real, de acordo com o protocolo descrito no capítulo III, no ponto 2.5 (pág. 21). As sequências dos “primers” para os genes das citocinas e para o gene HPRT encontram-se descritas na tabela 3.

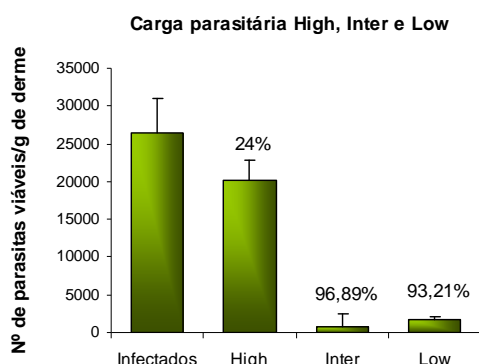
## 2.4 Análise estatística

Tanto para a carga parasitária como para a expressão de mRNA das diferentes citocinas, não foi possível a realização da análise estatística, uma vez que este trabalho só apresenta resultados obtidos de uma única experiência, sendo preciso no mínimo os resultados de três experiências para a realização de estudos de significância estatística. Deste modo, considerámos estes resultados preliminares.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Carga parasitária

O grupo de murganhos vacinados com a fracção proteica “High” e posteriormente infectados com *L. shawi* apresentou em média uma carga parasitária de  $2,02 \times 10^4$  promastigotas/g de derme, e uma redução da carga parasitária de 24% em relação ao grupo de animais apenas infectados (controlo) (Fig. 7), que apresentou uma carga parasitária de  $2,64 \times 10^4$  promastigotas/g de derme. Nas presentes condições experimentais, esta redução não parece ser suficiente para que a fracção proteica “High” seja considerada um antigénio



**Figura 7. Valores da carga parasitária** Murganhos infectados e vacinados com as fracções High, Inter e Low e posteriormente infectados

imunoprotector. Os animais vacinados com as fracções proteicas “Inter” e “Low”, apresentaram carga parasitária de  $8,21 \times 10^2$  e  $1,79 \times 10^3$ , que corresponde a uma redução de 96,89% e 93,21%, respectivamente (Fig. 7) quando comparados com o grupo controlo. Apesar de não ter sido possível a realização da análise estatística e os resultados serem considerados preliminares, estes dados sugerem uma boa capacidade imunoprotectora conferida pelas fracções “Inter” e “Low”, e um baixo nível de protecção da fracção “High”.

### 3.2 Citocinas expressas nos murganhos após vacinação com cada fracção proteica

O padrão de citocinas expresso *ex vivo* nos gânglios de murganhos estudados foi analisado de forma a determinar a resposta imunitária desenvolvida após a imunização e avaliar qual das imunizações origina uma melhor capacidade protectora.

#### “High”

No que diz respeito à imunização dos murganhos com a fracção proteica “High”, verificou-se nas células TCD8<sup>+</sup> um aumento dos níveis de IFN- $\gamma$  (Fig. 8 A), diminuição de IL-4 (Fig. 8 B), e ligeira manutenção ou redução de IL-10 (Fig. 8 C), TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  (Fig. 8 D e E) em relação aos animais infectados (Fig. 8 A - E). Este padrão de expressão de citocinas idêntico tanto no grupo de animais **1. vacinados e infectados** como nos **2. vacinados** revela um predomínio da resposta do tipo Tc1.

As células TCD4<sup>+</sup> apresentaram um padrão semelhante ao das células TCD8<sup>+</sup> anteriormente descrito nos animais **1. vacinados e infectados**. No entanto, no grupo de animais **2. vacinados** observa-se um aumento dos níveis de TGF- $\beta$  (Fig. 8 E) relativamente ao grupo controlo. O TGF- $\beta$  regula as respostas inflamatórias excessivas que podem provocar danos no organismo, contribuindo para a manutenção da homeostasia imunológica estando associado ao predomínio da resposta do tipo Th3. Desta forma, neste padrão de expressão a resposta do tipo Th3 pode estar associada à manutenção de infecção crónica e à atenuação dos sintomas da doença. Verificou-se também nos mesmos animais um aumento de TNF- $\alpha$  (Fig. 8 D) nestas células, que sinergisticamente com um aumento de IFN- $\gamma$  conduz à activação dos macrófagos e eliminação dos parasitas, apesar de se observar que esta activação não foi suficiente para eliminar os parasitas.

Curiosamente, a subpopulação dnCD4CD8 apresenta um padrão de citocinas oposto entre os dois grupos de animais, e diferente do das células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>. No grupo **1. vacinados e infectados** todas as citocinas diminuem os seus níveis (Fig. 8 A - E), enquanto que no grupo **2. vacinados** existe um acentuado aumento, sugerindo uma resposta mista Th1/Th2.

Resumidamente, esta fracção apresenta predomínio de resposta Tc1 apontando para a activação das células T citotóxicas (TCD8<sup>+</sup>).



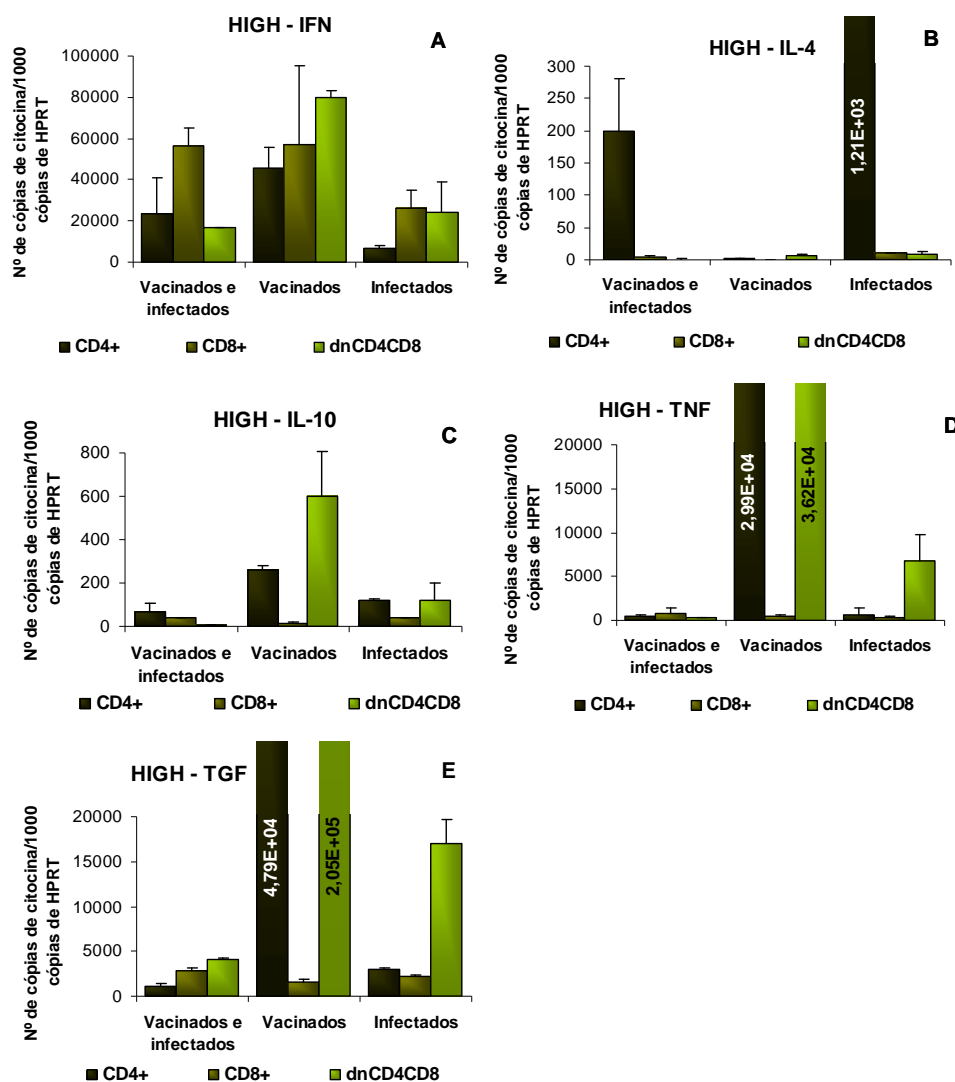


Figura 8. Número de cópias expressas de IFN- $\gamma$  (A), IL-4 (B), IL-10 (C), TNF- $\alpha$  (D), e TGF- $\beta$  (E) por 1000 cópias de HPRT, em subpopulações celulares de murganinhos vacinados com a fracção proteica High e infectados com *L. shawi*, e apenas infectados (controlo)

### “Inter”

A fracção “Inter” induziu as células TCD4<sup>+</sup> do grupo **2. vacinados** a aumentarem a expressão de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e TGF- $\beta$  (Fig. 9 A, C, D e E) e diminuíram a IL-4. O aumento da expressão de IL-10 e TGF- $\beta$  associado à baixa expressão de IL-4 e à elevada expressão de IFN- $\gamma$ , apontam para a regulação da actividade das células efectoras, conduzindo a uma resposta reguladora

As células TCD8<sup>+</sup> dos animais do grupo **2. vacinados** apresentaram níveis de IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  (Fig. 9 A, C, D, E) idênticos aos dos animais infectados, com excepção da IL-4 que diminuiu. As células dnCD4CD8, para além, de expressarem baixos níveis de IL-4 e

IFN- $\gamma$  apresentaram uma diminuição de IL-10, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  nos animais do grupo **2. vacinados**.

O grupo de animais **1. vacinados e infectados** apresenta um padrão de expressão em todas as células muito próximo ao do grupo **3. infectado (controlo)**, com excepção da IL-4 que tem tendência para diminuir.

De um modo geral, esta fracção evidencia no grupo **2. vacinados** uma resposta que contribui para a activação dos radicais oxidativos dos macrófagos e consequente destruição dos parasitas sem que seja despoletada a activação das células T<sub>reg</sub>.

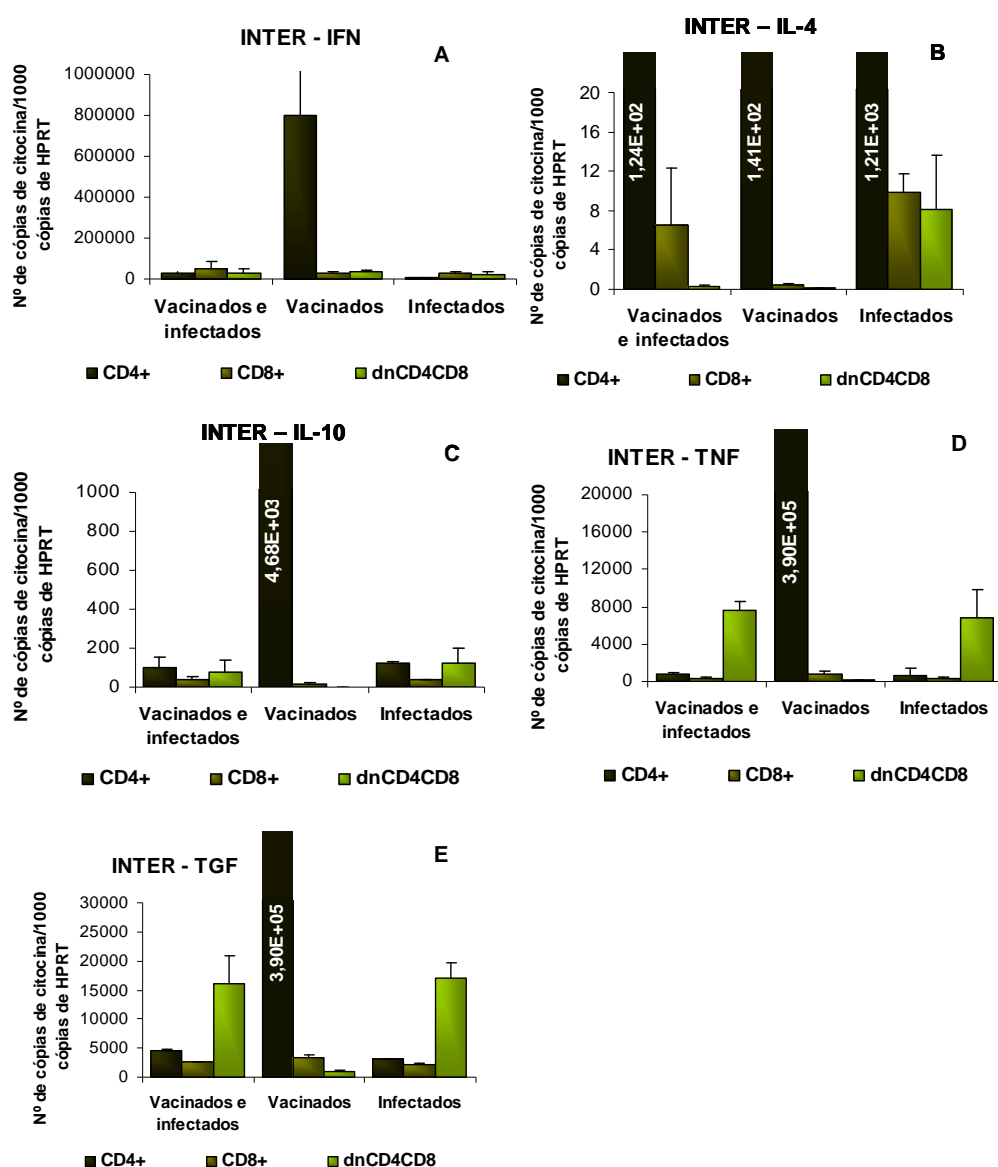


Figura 9. Número de cópias expressas de IFN- $\gamma$  (A), IL-4 (B), IL-10 (C), TNF- $\alpha$  (D), e TGF- $\beta$  (E) por 1000 cópias de HPRT, em subpopulações celulares de murganinhos vacinados com a fracção proteica Inter e infectados com *L. shawi*, e apenas infectados (controlo).

Apesar de esta fracção induzir níveis elevados de IL-10 e TGF- $\beta$  nas células TCD4<sup>+</sup>, estes não devem ser suficientes para inibir o IFN- $\gamma$  (citocina do tipo Th1), que se apresenta

elevado, que por sua vez aumenta o  $\text{TNF-}\alpha$ , como se observa, que contribui para a activação dos radicais oxidativos dos macrófagos, explicando a redução da carga parasitária.

### “Low”

A fracção proteica “Low” nos grupos **1. vacinados e infectados** e **2. vacinados**, induziu todas as subpopulação de células a diminuir o número de cópias de IL-4 (Fig.10 B) em relação ao grupo controlo. Para além disto, a população  $\text{CD4}^+$  apresentou também nos dois grupos um aumento de  $\text{IFN-}\gamma$  e níveis idênticos de IL-10 e  $\text{TGF-}\beta$  (Fig. 10 A, C e E). No entanto, o  $\text{TNF-}\alpha$  (Fig. 10 D) surgiu bastante aumentado nos animais do grupo **2. vacinados**.

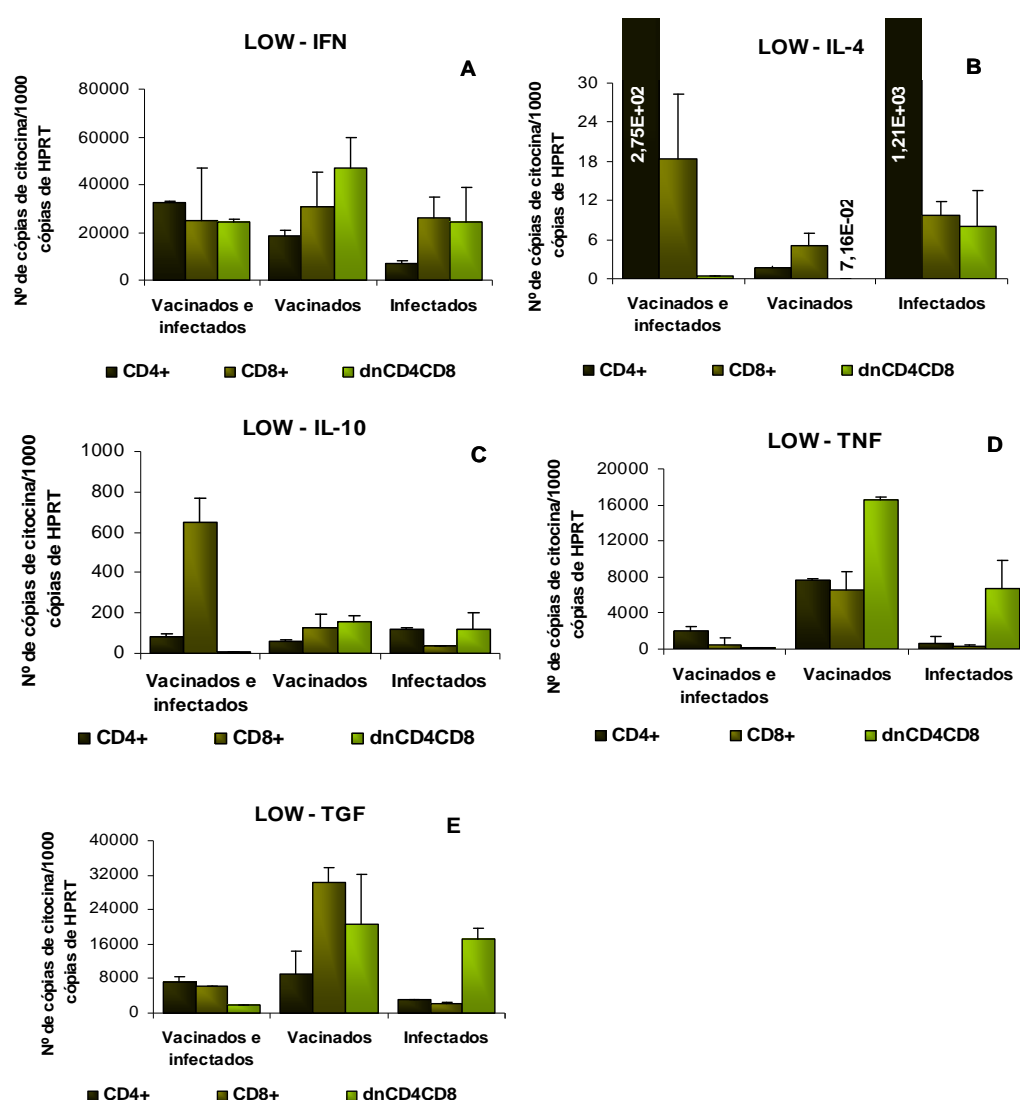


Figura 10. Número de cópias expressas de  $\text{IFN-}\gamma$  (A), IL-4 (B), IL-10 (C),  $\text{TNF-}\alpha$  (D), e  $\text{TGF-}\beta$  (E) por 1000 cópias de HPRT, em subpopulações celulares de murganhos vacinados com a fracção Low e infectados com *L. shawi*, e apenas infectados (controlo)

Estas considerações sugerem o predomínio de uma resposta do tipo Th1 por parte da subpopulação de células TCD4<sup>+</sup>.

As células TCD8<sup>+</sup> apresentaram no grupo **1. vacinados e infectados**, níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  (Fig. 10 A, D e E) idênticos ao grupo controlo e um aumento de IL-10 (Fig. 10 C) sugerindo a presença de uma resposta T reguladora.

No grupo de animais **2. vacinados** observou-se um aumento de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  e manutenção dos valores de IL-4 (reduzido), IL-10 e IFN- $\gamma$  em relação ao grupo infectado. Este padrão sugere que o TGF- $\beta$  aumentado pode contribuir para a regulação da actividade citotóxica das células TCD8<sup>+</sup>.

As células dnCD4CD8 dos animais **2. vacinados** apresentaram uma diminuição da IL-4 e do TGF- $\beta$  (Fig. 10 B e E), valores de IL-10 (Fig. 10 C) idênticos ao controlo e um aumento de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Fig. 10A e D) sugerindo uma importante contribuição para o controlo da infecção.

## V. CAPACIDADE IMUNOPROTECTORA DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES NA INFECÇÃO POR *L. INFANTUM*

A leishmaniose visceral zoonótica é uma infecção que afecta particularmente órgãos ricos em células do sistema mononuclear fagocítico, como, medula óssea, baço, gânglios e fígado. É uma doença endémica que afecta cães e seres humanos (Nieto *et al.*, 1999). *L. infantum* é o agente responsável pela leishmaniose visceral zoonótica, tem como reservatório principal o cão doméstico e alguns animais selvagens como chacais, raposas e roedores. Distribui-se pela China, África Oriental, Médio Oriente, Região Mediterrânica e América do Sul sendo responsável pela leishmaniose visceral humana e canina em Portugal (Rosa, 2005).

O conhecimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania* são fundamentais para o desenvolvimento de uma vacina. Este trabalho teve origem num trabalho anterior que estudou proteínas libertadas por *L. infantum*, onde se verificou que algumas fracções proteicas induziam protecção contra a infecção por *L. infantum* (Rosa *et al.*, 2007). Duas dessas proteínas foram identificadas como sendo a superóxido dismutase (SOD) e a ciclofilina A (CifA). Estas por sua vez foram isoladas e obtidas na forma recombinante para serem utilizadas em estudos de imunização.

A SOD é uma enzima libertada pelo parasita que poderá estar envolvida num mecanismo desenvolvido por *Leishmania* para escapar aos radicais livres de oxigénio produzidos pelos macrófagos hospedeiros, permitindo a sobrevivência intracelular do parasita (Ghosh *et al.*, 2003). No entanto, esta proteína pode eventualmente modular a resposta imunitária do

hospedeiro e ser uma forte ferramenta imunoprolática. Estudos de vacinação contra *Schistosoma mansoni* e *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* realizados em modelo roedor utilizaram a proteína SOD. A SOD mostrou níveis significativos de protecção contra a infecção por *M. avium* com desenvolvimento de uma boa resposta Th1 (Kumanan *et al.*, 2009). O estudo com *Schistosoma mansoni* revelou que a SOD tem potencial para actuar como vacina profilática, assim como vacina terapêutica, eliminando os parasitas infecciosos (LoVerde *et al.*, 2004).

As CifA são uma grande família de proteínas que desempenham um papel importante na fisiologia da célula, como protectores moleculares, denominados “chaperones”. Algumas destas proteínas podem ser libertadas pelas células em resposta a mediadores, às espécies reactivas do oxigénio e ao lipopolissacarídeo (LPS) dos microrganismos. Algumas CifA são produzidas por diversos protozoários, como *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*. Durante a infecção da célula hospedeira por *L. major* as CifA são segregadas e anticorpos anti-CifA produzidos controlando a infecção (Yurchenko *et al.*, 2007). Estes dados sugerem que as ciclofilinas podem ter um papel activo na modulação da imunidade do hospedeiro. Como tal este trabalho teve como objectivo avaliar o nível de protecção e analisar o tipo de resposta imunitária celular induzida em murganhos BALB/c pelas proteínas recombinantes (r) SOD e CifA de *L. infantum*.

Para avaliar a resposta imunitária celular desenvolvida, foi determinado por PCR em tempo real, o padrão de citocinas expresso pelas células TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e dnCD4CD8 dos baços de murganhos vacinados e infectados por *L. infantum*, utilizando como controlos murganhos saudáveis, vacinados com cada proteína, e murganhos unicamente infectados. Estes dados juntamente com a determinação da carga parasitária dos baços por LDA, permitiu avaliar o grau de protecção das proteínas recombinantes contra *L. infantum*, e determinar o seu potencial como vacina.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais e parasitas

Neste trabalho foram utilizados 30 murganhos BALB/c (*Mus musculus*) fêmeas com cinco a seis semanas de idade divididos em quatro grupos com cinco animais cada um: **1. vacinados** (CifA e SOD), **2. vacinados e infectados** (CifA + I e SOD + I), **3. infectados e** **4. saudáveis**.

Os murganhos foram adquiridos no IHMT e alojados no respectivo biotério de acordo com os requisitos da UE (86/609/CEE), reconhecido pela lei Portuguesa (DR DL129/92 e Portaria 1005/92).

A espécie utilizada para infectar os murganhos foi *L. infantum* MON-1 (estirpe MHOM/PT/89/IMT151) mantida por passagens sucessivas em murganhos BALB/c. O protocolo utilizado encontra-se descrito no capítulo III, ponto 2.1 (pág.18).

## **2.2 Proteínas recombinantes e obtenção de antígeno total de *L. infantum***

A identificação, o isolamento e a obtenção das formas recombinantes das proteínas SOD e CifA foram realizados e gentilmente cedidas pelo grupo de trabalho da Prof<sup>a</sup>. Ana Tomás do Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC, Porto, Portugal).

As proteínas foram concentradas a partir de sobrenadantes de promastigotas de *L. infantum* na fase estacionária. Foram separadas por SDS-PAGE seguidas de electroeluição e identificadas por espectrofotometria de massa. Após identificação, foram construídas por genética reversa, e produzidas em modelo bacteriano.

As proteínas recombinantes foram purificadas para remoção do LPS através de colunas de agarose de polimixina B (Pierce, U.S.A.) e quantificadas por espectrofotometria no Gene Quant II, utilizando a fórmula:  $1,55 \times A_{280 \text{ nm}} - 0,77 \times A_{260 \text{ nm}} = \text{mg/ml}$  (A, representa absorvância).

Para além das proteínas CifA e SOD, também foi preparado a partir de promastigotas numa concentração de  $10^8$  parasitas/ml, o antígeno total (AgT) de *L. infantum* que corresponde ao conjunto total de proteínas desta estirpe. Os promastigotas foram lavados com tampão fosfato salino (PBS) EDTA 2 mM, a 925 g durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspendido em 500 µl de água destilada. Em seguida foi iniciado um processo de lise celular através de seis ciclos de congelação e descongelação (-20°C, -70°C, temperatura ambiente), ao qual se seguiu uma centrifugação de 925 g com recolha dos sobrenadantes. Este foi quantificado por espectrofotometria anteriormente descrita, a sua concentração foi ajustada e foi conservado a -20°C até à sua utilização.

## **2.3 Vacinação/imunização e infecção**

Os animais dos grupos: vacinados e infectados e imunizados, foram imunizados intraperitonealmente, durante três semanas consecutivas, com uma dose semanal de 5 µg/ml por animal de cada uma das proteínas recombinantes juntamente com 1ug/ml por animal de IL-12 recombinante como adjuvante. Um estudo anterior mostrou que uma única dose de vacina constituída por antígenos ou proteínas recombinantes de *Leishmania* juntamente com um adjuvante IL-12 recombinante era totalmente segura e eficaz em murganhos e primatas para o modelo de leishmaniose cutânea (Kenney *et al.*, 1999).

Na sétima semana após a primeira imunização foi realizada a última (quarta) imunização com uma dose de 5 µg/ml por animal de cada uma das proteínas recombinantes sem adjuvante. Após sete dias da última imunização, os animais dos grupos 1 e 3, foram

infectados intraperitonealmente com 100 µl de uma suspensão com  $5 \times 10^6$  promastigotas de *L. infantum*.

A recolha do material biológico foi feita após os 30 dias de infecção. Os animais de todos os grupos foram sacrificados por deslocamento da cervical e os baços recolhidos e pesados.

#### **2.4 Avaliação da capacidade imunoprotectora das proteínas recombinantes**

Foi realizado um macerado e homogeneizado dos baços dos animais em meio SCH 10% FBS e feita uma diluição de 1:2. Posteriormente colocou-se 200 µl dessa diluição em quatro poços da primeira coluna de uma placa de 96 poços de fundo redondo (Nunc). O protocolo e a fórmula para o cálculo da concentração parasitária são idênticos ao anteriormente descrito neste trabalho, no capítulo III, ponto 2.4 (pág. 20).

Procedeu-se igualmente ao isolamento e separação das células TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e dnCD4CD8 dos baços, que posteriormente foram estimuladas.

Os linfócitos de todos os animais foram isolados a partir do homogeneizado dos baços por gradiente de densidade. O protocolo utilizado encontra-se descrito neste trabalho no capítulo V, ponto 2.4 (pág. 30).

Após isolamento,  $3 \times 10^5$  células (150 µl/poço) de cada tipo celular (TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e dnCD4CD8) foram cultivadas em triplicado numa placa de 96 poços utilizando 150 µl de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS e 1% de antibióticos.

Simultaneamente, para estimular a resposta secundária de cada tipo celular, foram adicionados 50 µl (10 µg/ml) de antígeno total de *L. infantum* e 50 µl (5 µg/ml) de cada uma das proteínas recombinantes, designando-se as amostras, como células estimuladas com AgT e com as proteínas SOD e CifA. Como controlo, foram adicionados a outros poços, 50 µl de meio RPMI com 10% de FBS a células designadas por não estimuladas (RPMI). As células foram incubadas durante 72 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> em atmosfera húmida. Findo o período de incubação as células foram recolhidas para posterior extracção do RNA e análise da expressão das citocinas *ex vivo* dos baços após vacinação, infecção e estímulo.

O RNA total foi extraído das células T CD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup> e dnCD4CD8 de acordo com protocolo do capítulo III, ponto 2.5 (pág. 20).

A expressão de mRNA das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-10, IL-4 e TNF- $\alpha$  foi quantificada por PCR em tempo real, de acordo com o protocolo do capítulo III, ponto 2.5 (pág. 21). As sequências dos “primers” para os genes das citocinas e para o gene HPRT encontram-se descritas na tabela 3.

#### **2.5 Análise estatística**

Tanto para a carga parasitária como para a expressão de mRNA das diferentes citocinas, não foi possível a realização da análise estatística, uma vez que este trabalho só apresenta

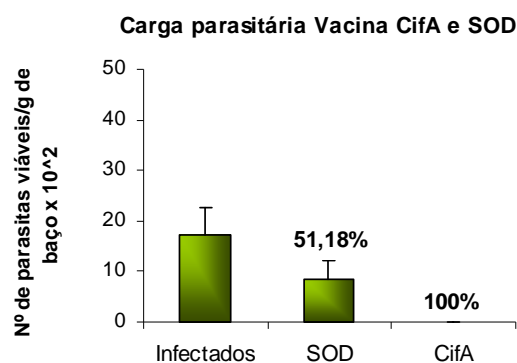
resultados obtidos de uma única experiência, sendo preciso no mínimo a realização de três experiências para que tenha relevância estatística. Deste modo, considerámos estes resultados, preliminares e resultados teste.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Carga parasitária

O grupo de murganhos **2. vacinados e infectados** com a proteína recombinante SOD, apresentou uma concentração de  $8,30 \times 10^2$  promastigotas/g de baço, enquanto que o grupo de murganhos infectados apresentou  $17,0 \times 10^2$  promastigotas/g de baço, evidenciando uma redução de 51,18% da carga parasitária (Fig. 11).

O grupo de murganhos **2. vacinados e infectados** com a proteína recombinante CifA não revelou a presença de parasitas nos baços, o que levou a considerar que esta proteína teve



**Figura 11. Valores da carga parasitária**

Murganhos infectados e vacinados com as proteínas recombinantes SOD e CifA e posteriormente infectados com *L.infantum*.

uma redução da carga parasitária de 100% (Fig. 11). No entanto, tal como tem sido revelado em trabalhos anteriores, estes dados devem ser complementados com os resultados obtidos na análise do padrão de citocinas expressas *ex vivo* dos baços, de forma a avaliar o tipo de resposta imunitária desenvolvida pelos diferentes grupos de murganhos, e assim avaliar o grau de protecção conferido por cada uma das proteínas recombinantes.

#### 3.2 Citocinas expressas nos murganhos após vacinação com cada proteína recombinante

##### CifA

Cada subpopulação celular, independentemente do estímulo que tenham recebido, apresentou nos dois grupos **1. vacinados** (CifA) e **2.vacinados e infectados** (CifA + I) o mesmo padrão de citocinas em relação aos grupos controlo.

As células TCD4<sup>+</sup> dos animais dos grupos **1. vacinados** e **2. vacinados e infectados** que receberam o estímulo CifA e AgT e as que não foram estimuladas (RPMI), mantiveram os níveis de IFN- $\gamma$ , IL-10 e TNF- $\alpha$  (Fig. 12), aumentaram acentuadamente os níveis de IL-4, e a IL-12 sofreu um aumento considerável nas células não estimuladas em relação aos grupos controlo **3. infectados** e **4. saudáveis**.

Estando a citocina IL-4 associada à diferenciação das células Th2 e a IL-12 à apresentação antigénica e à diferenciação de células Th1, este padrão de citocinas parece estabelecer um



equilíbrio, evitando o aumento de expressão de citocinas pro-inflamatórias ou associadas à regulação da resposta imunitária.

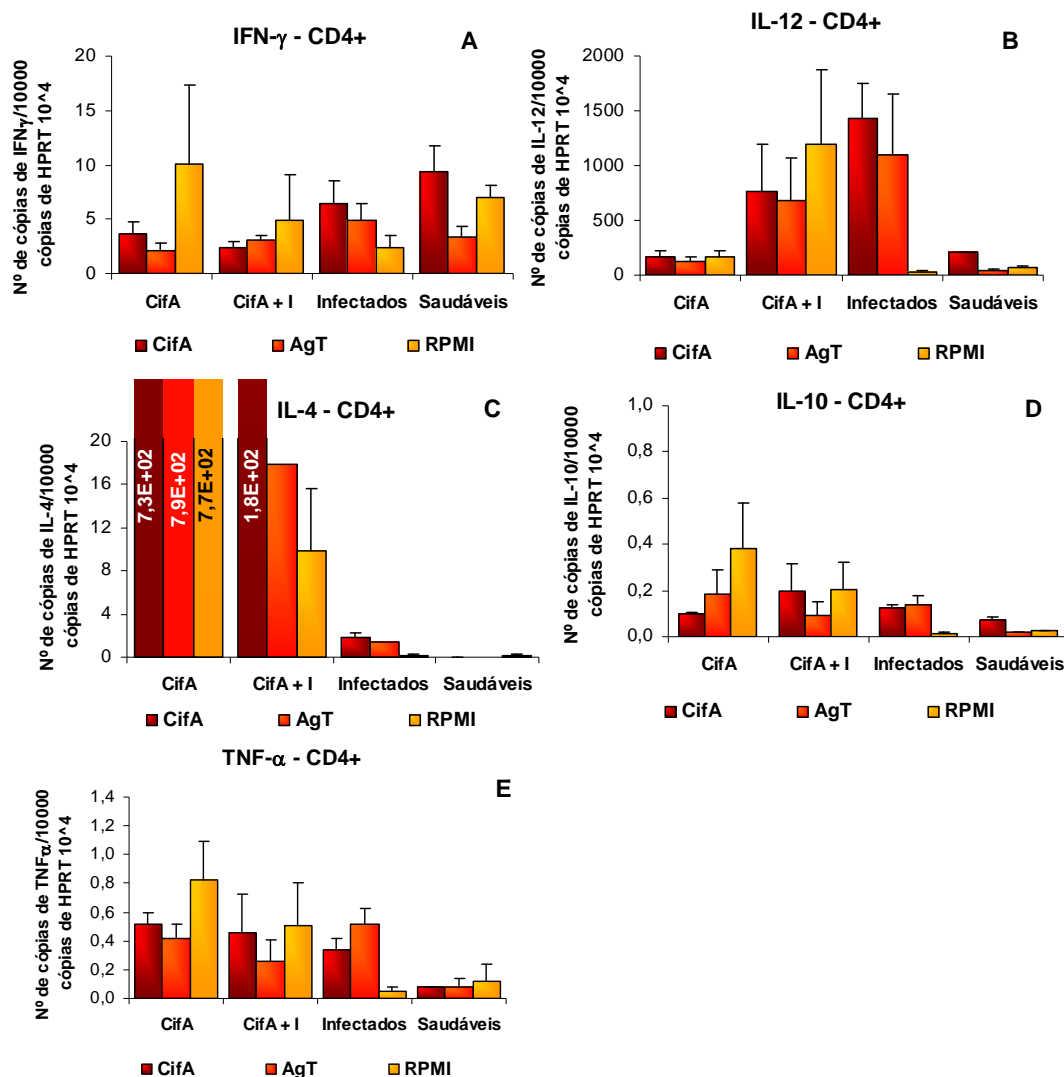


Figura 12. Número de cópias expressas pelas células TCD4+ de IFN-γ (A), IL-12 (B), IL-4 (C), IL-10 (D) e TNF-α (E) por 10000 cópias de HPRT. Estimuladas com CifA, AgT e RPMI. Murganhos vacinados com CifA; vacinados com CifA e infectados com *L. infantum*; infectados com *L. infantum* (controle) e saudáveis. Devido à escala do eixo dos Y os valores dos respectivos grupos estão assinalados nos gráficos.

As células TCD8<sup>+</sup> (Fig. 13), quando estimuladas com a CifA e o AgT apresentaram um padrão de citocinas semelhante entre si mas diferente do das células não estimuladas.

Nos dois grupos de animais **1. vacinados** e **2. vacinados e infectados** a estimulação adicional das células TCD8<sup>+</sup> com a proteína CifA induziu ao aumento dos níveis de IL-12, IL-4 e IL-10, mantendo todos os outros.

Contudo, as células quando estimuladas com AgT evidenciaram um aumento da expressão de IL-12, IL-4 e IFN-γ, sugerindo o desenvolvimento de uma resposta mista Th1/Th2.

De forma idêntica, as células que não foram sujeitas a estimulação exógena apresentaram um aumento da expressão de IL-4 nos animais **1. vacinados** e níveis elevados de IFN-γ e IL-12 nos animais **2. vacinados e infectados**.

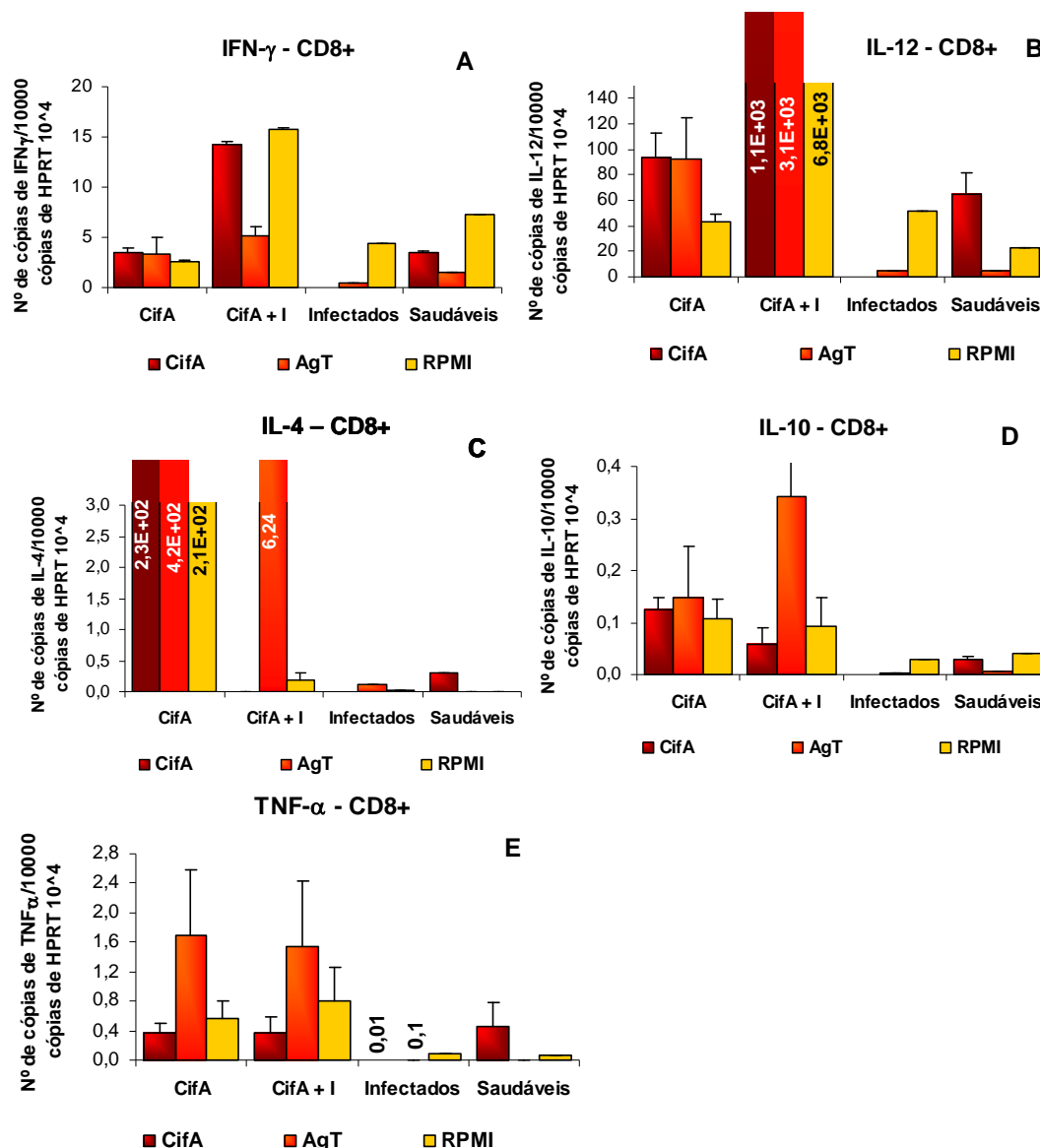


Figura 13. Número de cópias expressas pelas células TCD8+ de IFN-γ (A), IL-12 (B), IL-4 (C), IL-10 (D) e TNF-α (E) por 10000 cópias de HPRT. Estimuladas com CifA, AgT e RPMI. Murganinhos vacinados com CifA; vacinados com CifA e infectados com *L. infantum*, infectados com *L. infantum* e saudáveis. Devido à escala do eixo dos Y os valores dos respectivos grupos estão assinalados nos gráficos.

As células dnCD4CD8 (Fig. 14) apresentaram um padrão de citocinas um pouco diferente do verificado nas células TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.

Em ambos os grupos, **1. vacinados** e **2. vacinados e infectados** as células dnCD4CD8 estimuladas com a proteína CifA e com o AgT apresentaram níveis de IFN-γ, IL-10 e TNF-α semelhantes aos dos animais dos grupos controlo (infectados e saudáveis). Simultaneamente, o grupo **2. vacinados e infectados** aumentou os níveis de IL-12 e diminuiu os de IL-4, sugerindo um resposta do tipo Th1, enquanto que o grupo **2. vacinados** aumentou a expressão de IL-4.

As células dnCD4CD8 não estimuladas mantiveram os valores de IL-10 e TNF-α e aumentaram os de IL-12 nos dois grupos de animais (CifA e CifA + I). O grupo **1. vacinados**

aumentou os valores de IL-4, porém, o grupo 2. vacinados e infectados aumentou os níveis de IFN- $\gamma$  e diminuiu IL-4, apontando para o desenvolvimento de uma resposta pró-inflamatória.

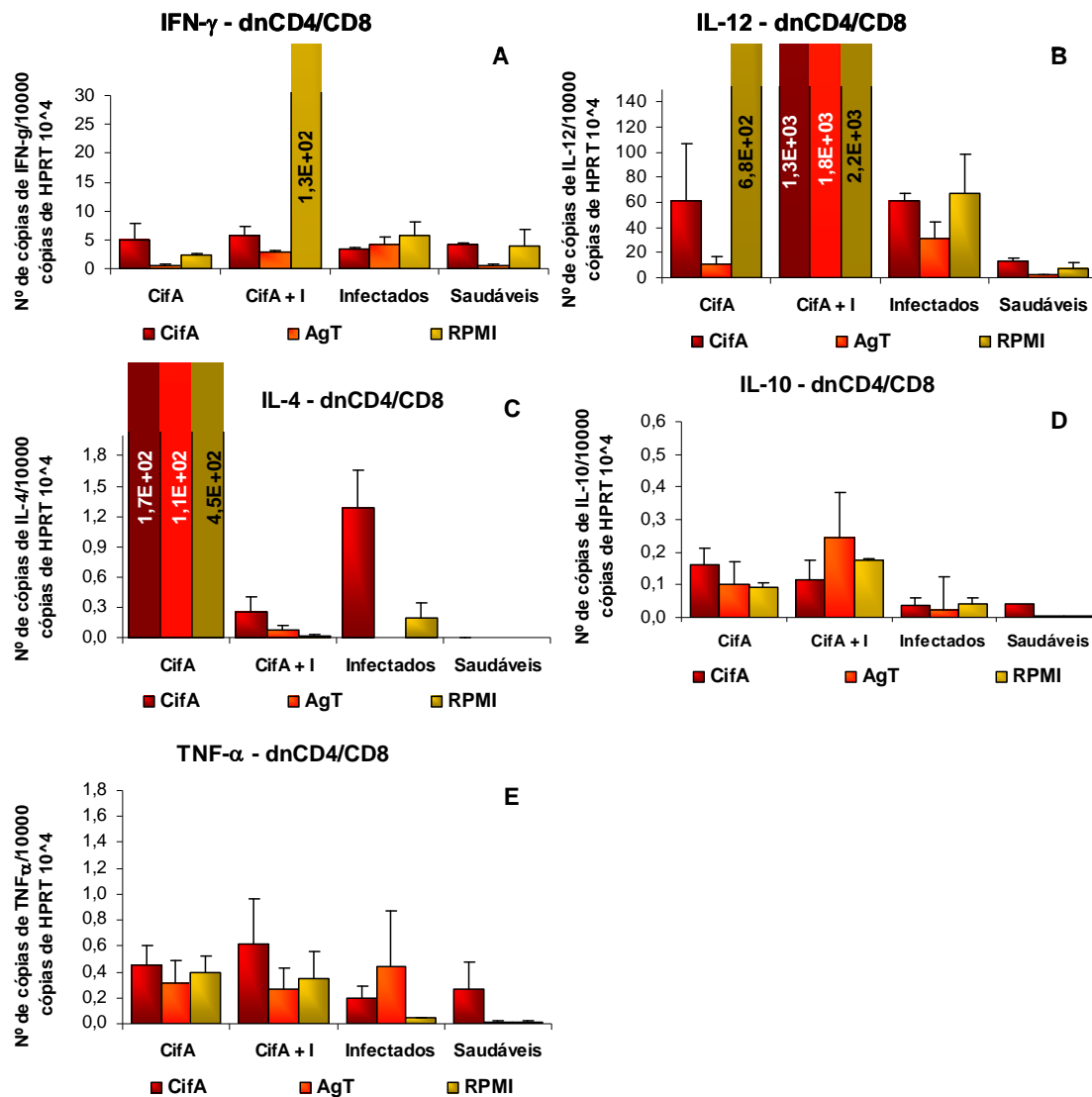


Figura 14. Número de cópias expressas pelas células dnCD4/CD8 de IFN- $\gamma$  (A), IL-12 (B), IL-4 (C), IL-10 (D) e TNF- $\alpha$  (E) por 10000 cópias de HPRT. Estimuladas com CifA, AgT e RPMI. Murganinhos vacinados com CifA; vacinados com CifA e infectados com *L. infantum*; infectados com *L. infantum* (controle) e saudáveis. Devido à escala do eixo dos Y os valores dos respectivos grupos estão assinalados nos gráficos.

Resumidamente, nos animais **2. vacinados e infectados** as subpopulações de células TCD8<sup>+</sup> e dnCD4CD8 quando em contacto com a proteína vacinal apresentaram uma acentuada diminuição de IL-4 e aumento de IL-12. Este padrão acompanhado por níveis elevados de IFN- $\gamma$  nas células TCD8<sup>+</sup> aponta para o desenvolvimento de uma resposta citotóxica do tipo Tc1 (Th1).

Por outro lado o padrão de citocinas expresso pelas células TCD4<sup>+</sup> aponta para o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th2.

Em suma, a proteína recombinante ciclofilina A parece ter tido influência no desenrolar da infecção, conferindo protecção total, regulando a activação das células T citotóxicas para a destruição dos parasitas. Apesar destes resultados, é importante que mais estudos sejam feitos para avaliar melhor o efeito imunoprotector desta proteína

## **SOD**

Nos dois grupos **1. vacinados** e **2. vacinados e infectados** com a proteína SOD, as células TCD4<sup>+</sup> (Fig. 15) quando estimuladas com a SOD e o AgT revelaram uma diminuição acentuada dos níveis de IL-12 (associada à resposta Th1) e mantiveram os níveis de todas as outras citocinas em relação ao grupo infectado.

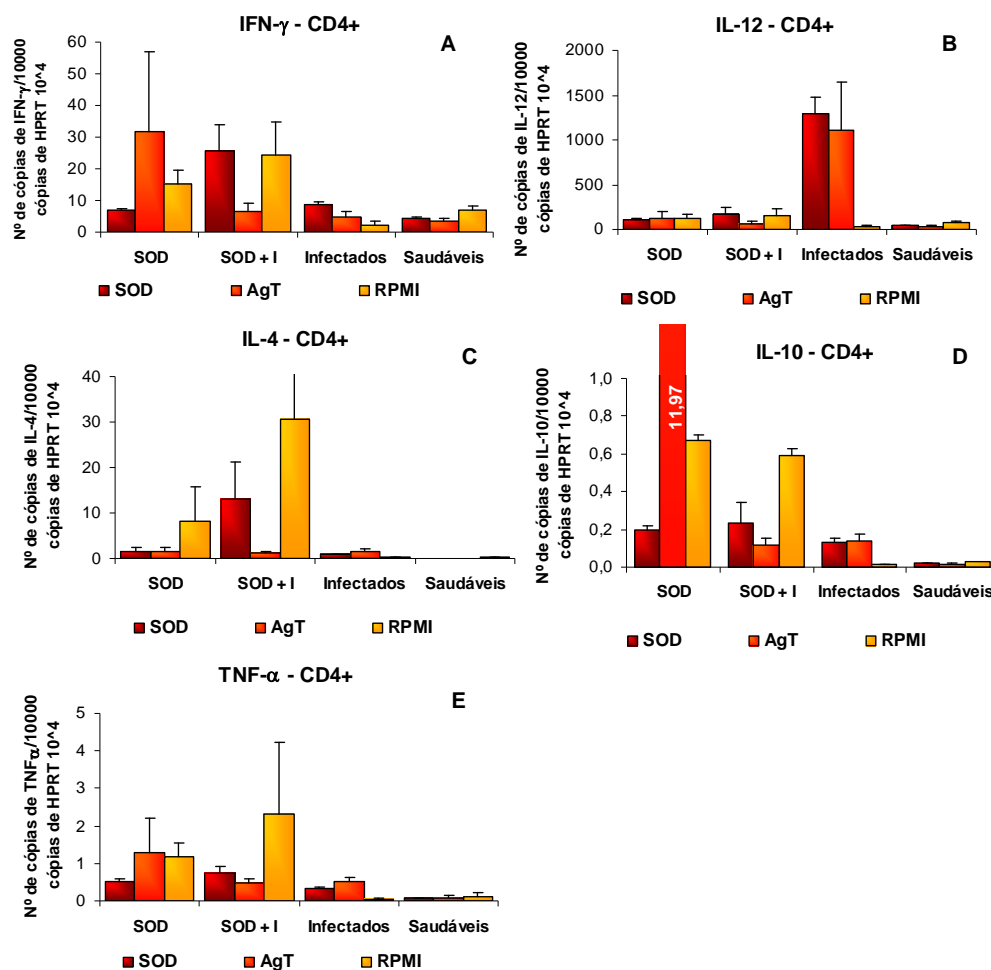


Figura 15. Número de cópias expressas pelas células TCD4<sup>+</sup> de IFN-γ (A), IL-12 (B), IL-4 (C), IL-10 (D) e TNF-α (E) por 10000 cópias de HPRT. Estimuladas com SOD, AgT e RPMI. Murganços vacinados com SOD; vacinados com SOD e infectados com *L. infantum*, infectados com *L. infantum* (controlo) e saudáveis.

A citocina IL-12 está associada à apresentação antígenica, à diferenciação das células Th1 e á activação dos mecanismos leishmanias do macrófago, no entanto, não existe justificação para que ocorra expressão elevada de IL-12, uma vez que não se observou a presença de parasitas pela técnica de LDA nestas células.

Relativamente às células não estimuladas, estas apresentaram um aumento dos níveis de IL-10, IL-4, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  apontando para um equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 exercendo algum controlo sobre a multiplicação parasitária mas permitindo a manutenção da infecção.

De uma forma geral, as células TCD8<sup>+</sup> (Fig. 16) nos dois grupos (1. **vacinados** e 2. **vacinados e infectados**) aumentaram os níveis de expressão de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$  sugerindo o desenvolvimento de uma resposta efectora citotóxica que pode ter contribuído para a redução da carga parasitária, como mostra o estudo de Groux *et al.*, (1999). E para além disso a produção de TNF- $\alpha$  pode ter contribuído para estimular a actividade leishmanicida dos macrófagos.

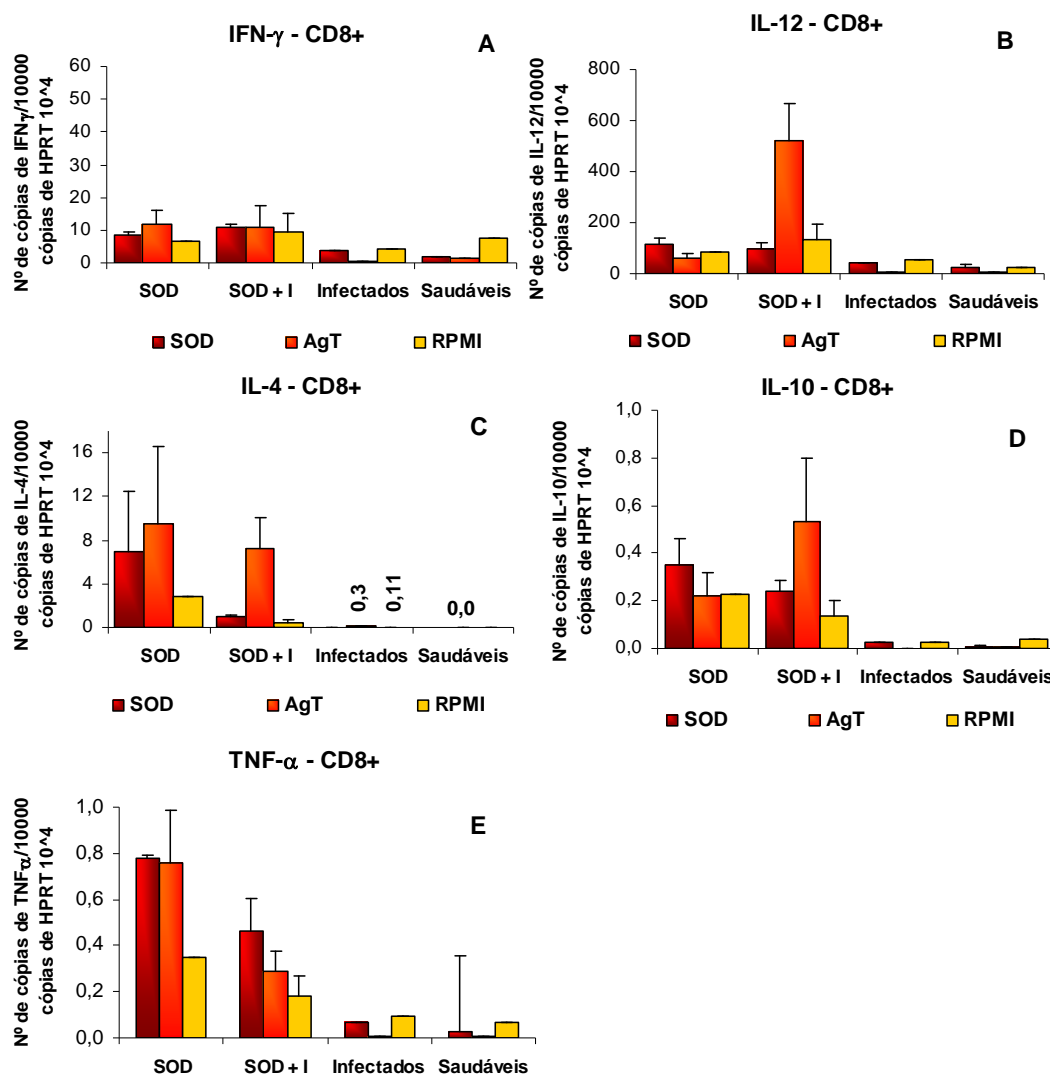


Figura 16. Número de cópias expressas pelas células TCD8<sup>+</sup> de IFN- $\gamma$  (A), IL-12 (B), IL-4 (C), IL-10 (D) e TNF- $\alpha$  (E) por 10000 cópias de HPRT. Estimuladas com SOD, AgT e RPMI. Murganinhos vacinados com SOD; vacinados com SOD e infectados com *L. infantum*; infectados com *L. infantum* (controlo) e saudáveis. Devido ao eixo dos Y os valores dos respectivos grupos estão assinalados nos gráficos.

Em ambos os grupos de animais (1. vacinados e 2. vacinados e infectados) as células dnCD4CD8 (Fig. 17) não estimuladas evidenciaram aumentos da expressão de todas as

citocinas analisadas, enquanto as células quando estimuladas com a proteína SOD revelaram apenas um aumento dos níveis de IL-4, em relação aos grupos controlo.

Estes resultados demonstram que a imunização com a proteína recombinante SOD induziu a estimulação das células dnCD4/CD8 a expressar citocinas pró e anti-inflamatórias.

Contudo, o balanço entre os dois tipos de citocinas (do tipo Th1 e Th2) pode ter contribuído para uma menor redução da carga parasitária como se observa pela técnica de LDA.

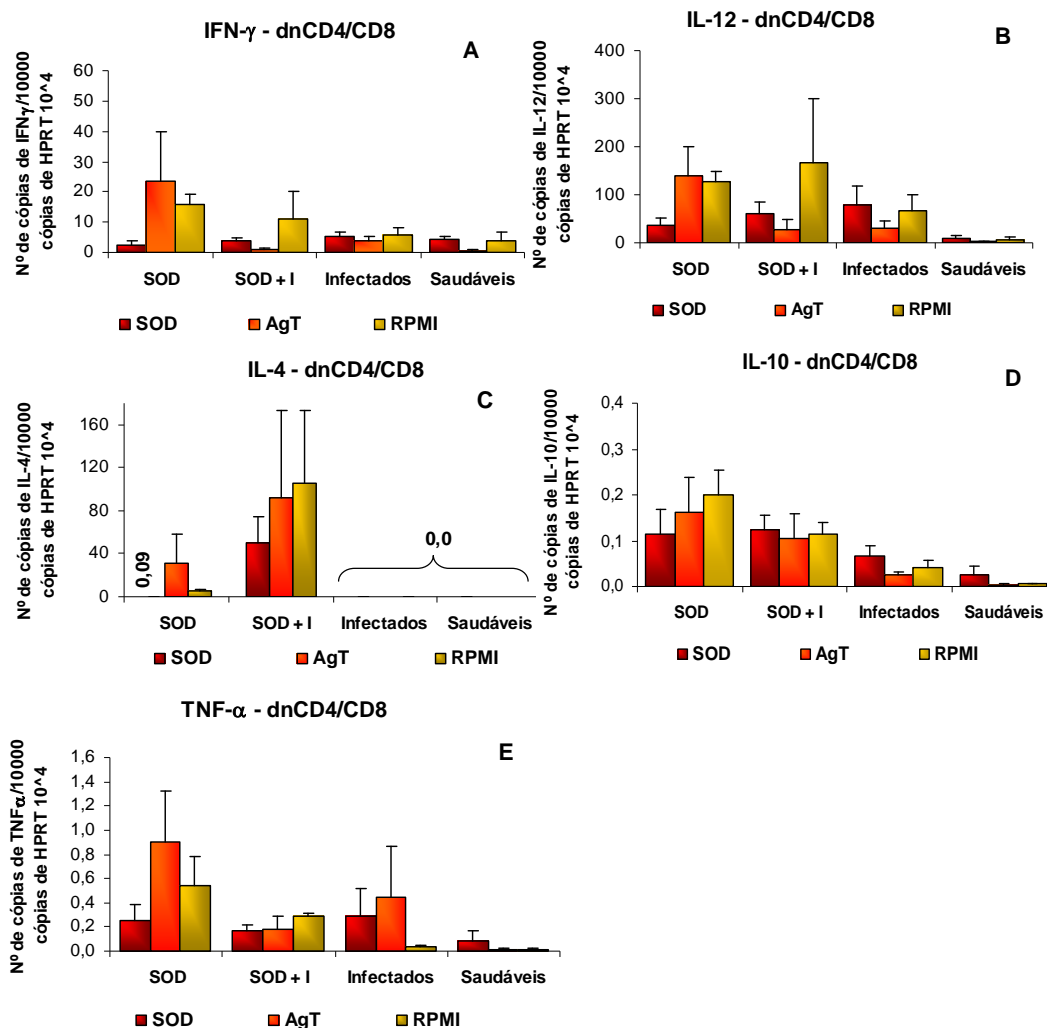


Figura 17. Número de cópias expressas pelas células dnCD4/CD8 de IFN-γ (A), IL-12 (B), IL-4 (C), IL-10 (D) e TNF-α (E) por 10000 cópias de HPRT. Estimuladas com SOD, AgT e RPMI. Murganhos vacinados com SOD; vacinados com SOD e infectados com *L. infantum*; infectados com *L. infantum* (controlo) e saudáveis. Devido ao eixo dos Y os valores dos respectivos grupos estão assinalados nos gráficos.

A imunização com SOD originou uma estimulação ligeira das subpopulações celulares analisadas sem que se verificasse um predomínio de respostas imunológicas associadas ao grupo controlo eficiente da carga parasitária. Assim, nas presentes condições experimentais a SOD parece conferir uma ligeira protecção contra a infecção.

No entanto, este estudo deverá ser continuado efectuando-se algumas alterações nas condições da experiência, como por exemplo: (i) aumentar a quantidade de proteína e adjuvante; (ii) ajustes ao protocolo; (ii) repetir pelo menos mais duas vezes, não só para ser

possível a realização de uma análise estatística dos resultados mas para avaliar melhor a capacidade imunoprotectora que esta proteína tem para a *L. infantum*.

## VI. CONCLUSÃO GERAL

As formulações dos dois compostos na forma lipossomal apresentaram importante redução da carga parasitária nos baços após o tratamento de murganhos com *L. infantum*, insinuando que a inclusão de compostos em lipossomas poderá ser uma boa estratégia terapêutica. No entanto, o tratamento com o composto TFL6 não alterou a resposta imunitária do hospedeiro mantendo um padrão de citocinas semelhante ao dos animais infectados, à excepção da redução da IL-12. O composto TFL7 apresentou o predomínio de uma resposta regulatória que poderá contribuir para a infecção crónica e atenuação das citocinas do tipo Th1. Este trabalho permite como perspectiva futura seleccionar a melhor formulação a ser testada, em cães naturalmente e experimentalmente infectados.

Quanto às fracções antigénicas de *L. shawi*, a Inter e a Low apresentaram boa capacidade imunoprotectora impedindo a multiplicação do parasita. A fracção Inter mas maioritariamente a fracção Low induziram a expressão de citocinas protectoras como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e reduziram a expressão de IL-4, desencadeando uma resposta imunitária do tipo Th1. A expressão elevada de IL-10 e TGF- $\beta$ , citocinas que estão associadas à regulação da resposta imunitária, pode estar relacionada com a presença residual de parasitas essenciais para a manutenção da memória imunitária. Assim o estudo destas fracções como potenciais vacinas deverá ter continuidade não só para optimização do protocolo de imunização, mas também para melhor compreensão da capacidade imunoprotectora destas fracções tanto em murganhos como noutro modelo animal experimental.

A proteína recombinante CifA, contrariamente à proteína SOD, conferiu protecção total contra a infecção por *L. infantum* em modelo roedor. Para além disso a imunização com esta proteína recombinante conduziu ao desenvolvimento de uma resposta citotóxica que deve ter participado na eliminação dos parasitas. Actualmente, está a ser realizado o estudo das células memória desenvolvidas após a vacinação com cada proteína recombinante por citometria de fluxo.

Futuramente, as proteínas que impedirem o estabelecimento da infecção associada a uma resposta imunitária celular protectora e ao estabelecimento da memória imunológica serão seleccionadas para ensaios de optimização do protocolo de imunização. O estabelecimento da dose da vacina e do adjuvante, número de administrações, via de administração e intervalo entre as imunizações é importante para a optimização das condições de vacinação.

Confirma-se que os linfócitos T têm sensibilidades diferentes aos antígenos diversos, resultando padrões de citocinas únicos que no caso das proteínas recombinantes de *Leishmania* têm consequências no decurso da infecção.

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. Abranches, P., F.M. Conceição-Silva, M.M. Ribeiro, F.J. Lopes, and L.T. Gomes (1983). Kala-azar in Portugal - IV. The wild reservoir: the isolation of a *Leishmania* from a fox. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 77, 420 - 421.
2. Abranches, P., F.M. Conceição-Silva, and M.C. Silva-Pereira (1984). Kala-azar in Portugal. V. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrábida. J. Trop. Med. Hyg. 87, 197-200.
3. Barbosa, W., ZB. Pinheiro, and RL. Oliveira (1973). Electroimunodifusão no diagnóstico do calazar com os antígenos de *Leishmania donovani*, *Leishmania braziliensis*, *Leptomonas pessoai*. Resultados preliminares. Rev. Patol. Trop. 4, 377 - 386.
4. Basano, S.A., and L.M.A. Camargo (2004). Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controlo. Rev. Bras. Epidemiol. 3, 328 – 337.
5. Bhattacharya, S., S. Ghosh, P. Jhonson, S.K. Bhattacharyya, and S. Majumdar (2001). Immunomodulatory role of interleukin-10 in visceral leishmaniasis: defective activation of protein kinase C-mediated signal transduction events. Infect. Immun. 69, 1499-1507.
6. Bhattacharya, G., M. Manar Salem, and K.A. Werbovetz (2002). Antileishmanial dinitroaniline sulfonamides with activity against parasite tubulin. Bioorg. Med. Chem. Lett. 12, 2395 – 2398.
7. Cabrera, M., J.M. Blackwell, M. Castes, D. Trujillo, J. Convit, and M.A. Shaw (2000). Immunotherapy with live BCG plus heat killed *Leishmania* induces a T helper 1-like response in American cutaneous leishmaniasis patients. Parasite Immunol. 22, 73 – 79.
8. Carvalheiro, M., J. Jorge, C. Eleutério, A.F. Pinhal, A.C. Sousa, J.G. Morais, and M.E.M. Cruz (2009). Trifluralin liposomal formulations active against *Leishmania donovani* infections. Eur. J. Pharmaokinet. Biopharm. 71, 292 – 296.
9. Cavaliero, T., P. Arnold, A. Mathis, T. Glaus, R. Hofmann-Lehmann, and P. Deplazes (1999). Clinical, serologic and parasitologic followup after long term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. J. Vet. Intern. Med. 13, 330 – 334.
10. Chamizo, C., J. Moreno, and J. Alvar (2005). Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. Vet. Immunol. Immunopathol. 103, 67 – 75.
11. Chan, M.M., and D. Fong (1990). Inhibition of leishmanias but not host macrophages by the antitubulin herbicide trifluralin. Science 249, 924 – 926.
12. Chappuis, F., S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R.W. Peeling, J. Alvar, and M. Boelaert (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nature, 872 – 882.
13. Cohen-Freue, G., T.R. Holzer, J.D. Forney, and W.R. McMaster (2007). Global gene expression in *Leishmania*. Int. J. Parasitol. 37, 1077 – 1086.
14. Croft, S.L., S. Sundar, and A.H. Fairlamb. (2006). Drug Resistance in Leishmaniasis. Clin. Microbiol. Rev. 111–126.
15. a. Cruz, M.E.M., M.C. Carvalheiro, and J.C.S. Jorge (2005). Dinitroaniline liposomal formulations and processes for their preparation. Patente EP1030653 B1.



16. b. Cruz, M.E.M., M.M. Gaspar, M.B. Martins, and M.L. Corvo (2005). Liposomal superoxide dismutase and their use in treatment of experimental arthritis. In: Duzgunes, N.(Ed.), *Methods Enzymol.* 391, 95 – 413.
17. Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 305 – 318.
18. Farraia, J.A. and S. Meireles (2008). Terapêutica e profilaxia. In: *Leishmaniose canina. Santos-Gomes, G.M., and I.P. Fonseca* (eds.). Merial e Chaves Ferreira publicações. Lisboa. Capítulo VII. 93-103.
19. Ferretti, S., O. Bonneau, G. R. Dubois, C. E. Jones, and A. Trifilieff (2003). IL-17, Produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J. Immunol.* 170, 2106 –2112.
20. Fiorentino, D.E., M.W. Bond, and T.R. Mosmann (1989). Two types of mouse T helper cells. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 170, 2081-2095.
21. Fonseca, I.P. and M.T.V. de Brito (2008). Diagnóstico. In: *Leishmaniose canina. Santos-Gomes, G.M., and I.P. Fonseca* (eds.) Merial e Chaves Ferreira publicações. Lisboa. Capítulo VI. 83-92.
22. Ghosh, S., S. Goswami, S. Adhya (2003). Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage. *J. Sanjay Biochem.* 369, 447 - 452.
23. Gradoni, L., V. Foglia Manzillo, A. Pagano, D. Piantedosi, R. De Luna, M. Gramiccia, A. Scalone, T. Di Muccio, and G. Oliva (2005). Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine* 23, 5245 – 5251.
24. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J.E. de Vrie, and M.G. Roncarolo (1999). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737-742.
25. Goto, H., and J.A.L. Lindoso (2004). Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 615 – 623.
26. Handman, E. (2001). Leishmaniasis: Current status of vaccine development. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 229 – 243.
27. Handman, E., and D.V.R. Bullen (2002). Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* 18, No.8. 417
28. Holland, P.M., R.D. Abramson, R. Watson, and D.H. Gelfand (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'- 3' exonuclease activity of *thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 88, 7276 – 7280.
29. João, A., M.A. Pereira, S. Cortes, and G.M. Santos-Gomes (2006). Canine Leishmaniasis Chemotherapy: Dog's Clinical Condition and Risk of *Leishmania* Transmission *J. Vet. Med.* 53, 540 – 545.
30. Kamau, S. W., M. Hurtado, U.U. Muller-Doblies, F. Grimm, and R. Nunez (2000). Flow cytometric assessment of allopurinol susceptibility in *Leishmania infantum* promastigote. *Cytometry* 40, 353 – 360.
31. Kane, M.M., and D.M. Mosser (2001). The role of IL-10 in promoting disease progression in Leishmaniasis. *J. immunol.* 166, 1141-1147

32. Kenney, R.T., D.L. Sacks, J.P. Sypek, L. Vilela, A.A. Gam, and K. Evans-Davis (1999). Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. *J. immunol.* 163, 4481- 4488.
33. Kumanan, K., V. Kumanan, S. McDonough, L.H. Chen, S.U. Park, M.A.S. Moreira, B. Akey, J. Huntley, Chao-Fu Chang, and Yung-Fu Chang (2009). Evaluation of immune responses and protective efficacy in a goat model following immunization with a cocktail of recombinant antigens and a polyprotein of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Vaccine* 27, 123 –135.
34. Liew, F.Y., Y. Li, and S. Millott (1990). Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J. Immunol.* 145, 4306 - 4310.
35. Lipoldová, M., and P. Dermant (2006). Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat. Rev. Genet.* 7, 294 – 305.
36. LoVerde, P.T., C. Carvalho-Queiroz, and, R. Cook (2004). Vaccination with antioxidant enzymes confers protective immunity against challenge infection with *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99, 37- 43.
37. Machado, P., M.I. Araújo, L. Carvalho, and E. Carvalho (2004). Mecanismos de resposta imune às infecções, “Immune response mechanisms to infections”. *An. Bras. Dermatol.* 76, 47- 664.
38. Maia, C., JM. Cristóvão, J. Ramada, N. Rolão, and L. Campino (2006). Diagnóstico da Leishmaniose canina pela técnica de PCR aplicada a sangue periférico em papéis de filtro – resultados preliminares. *J. Vet. Med.* 8, 29 - 33.
39. Marques, C., M. Carvalheiro, M.A. Pereira, J. Jorge, M.E.M. Cruz, and G.M. Santos-Gomes (2008). Efficacy of the liposome trifluralin in the treatment of experimental canine leishmaniasis. *Vet. J.* 178, 133 – 137.
40. Morejohn, L.C., T.E. Bureau, J. Mole-Bajer, A.S. Bajer, and D.E. Fosket (1987). Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. *Planta* 172, 252 – 264
41. Moreno, J. and J. Alvar (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 9, 399 – 404.
42. Murray, H. (2004). Treatment of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71, 787–794.
43. Murray, H.W., J.D. Berman, C. Davies, N.G. Saravia (2005). Advances in leishmaniasis. *Semin. Lancet* 366, 1561 –77.
44. Neuber, H (2008). Leishmaniasis. *JDDG.* 9, 754 –765.
45. Nieto, C.G., M. García-Alonso, J.M. Requena, C. Mirón, M. Soto, C. Alonso, and I. Navarrete (1999). Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 6, 117-130.
46. Oswald, I.P., R.T. Gazzinelli, A. Sher, and S.L. James (1992). IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J. Immunol.* 148, 3578 - 82.
47. Parham, P (2000). The immune system. Garland Publishing/Elsiever Science Ltd. Germany.
48. Pereira, S. (2003). Infecção por *Leishmania infantum* no modelo murino: influência do haplótipo H-2 na resposta imunitária celular. Dissertação de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical. P.168

49. Powrie, F., and R. Coffman (1993). IL-4 and IL-10 inhibit DTH and IFN- $\gamma$  production. *Eur. J. Immunol.* 23, 2223 – 2229.
50. Rodrigues, O.L., C. Marques, M. Soares-Clemente, M. H. Ferronha, G. M. and Santos-Gomes (2009). Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. *Immunobiology* 214, 101 –111.
51. Rosa, R. (2005). Estudo da resposta imunitária induzida por proteínas libertadas por promastigotas de *Leishmania infantum*. Dissertação de Doutoramento. Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical. p.191
52. Rosa, R., C. Marques, O.R. Rodrigues, and G.M. Santos-Gomes (2007). Immunization with *Leishmania infantum* released proteins confers partial protection against parasite infection with a predominant Th1 specific immune response. *Vaccine*. 25, 4525 – 4532.
53. Santos-Gomes, G.M., and P. Abranches (1996). Comparative study of infectivity caused by promastigotes of *Leishmania infantum* MON-1, *L. infantum* MON-24 and *L. donovani* MON-18. *Folia Parasitol.* 43, 7-12.
54. Santos-Gomes, G.M., R. Rosa, C. Leandro, S. Cortes, P. Romão, and H. Silveira (2002). Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *J. Vet. Immunol. Immunopathol.* 88, 21– 30.
55. Santos-Gomes, G.M., O.R. Rodrigues, and C. Marques (2008). Resposta imunitária. In: *Leishmaniose canina. Santos-Gomes, G.M., and I.P. Fonseca* (eds.). Merial e Chaves Ferreira publicações. Lisboa. Capítulo V, 69-82.
56. Sedlik, C. (1996). Les sous-populations de lymphocytes Th1 et Th2: caractérisation, rôle physiologique et regulation. *Bull. Inst. Pasteur* 94, 173 – 200.
57. Shaw, J.J., and R. Lainson (1975). Leishmaniasis in Brazil: Some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 69, 323 - 335.
58. Shaw, J. (1994). Taxonomy of the genus *Leishmania*. Present and future trends and their implications. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89, 471- 478.
59. Singh, S. (2006). New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* 123, 311-330.
60. Sundar, S. (2001). Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health* 6, 849 - 854.
61. WHO (2007). Report of the consultative meeting on cutaneous leishmaniasis. Geneva, WHO Headquarters, 30 April to 2 May. [http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Cutaneous\\_leish\\_cm\\_2008.pdf](http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Cutaneous_leish_cm_2008.pdf)
62. Yakovich, A.J., F.L. Ragone, J.D. Alfonzo, D.L. Sackett, and K.A. Werbovetz (2006). *Leishmania tarentolae*: Purification and characterization of tubulin and its suitability for antileishmanial drug screening. *Exp. Parasitol.* 114, 289 – 296.
63. Yurchenko, V., Z. Xue, B. Sherry, and M. Bukrinsky (2007). Functional analysis of *Leishmania* major cyclophilin. *J. Parasitol.* 38, 633 – 639.
64. Zambrano-Villa, S., D. Rosales-Borjas, J. C. Carrero, and L. Ortiz-Ortiz (2002). How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol.* 18, No.6, 272 – 278.